



**Facultad
de Química**



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

**Desarrollo de un material de referencia certificado de
yerba mate para determinaciones de arsénico, cadmio,
fósforo, plomo y sodio**

Qco. Ramiro Pérez Zambra

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Noviembre 2025

**Desarrollo de un material de referencia certificado de
yerba mate para determinaciones de arsénico, cadmio,
fósforo, plomo y sodio**

Tribunal:

Dra. Lucía Pareja

Dra. María Noel Cabrera

Dr. Ignacio Vieitez

Prof. Agregada Dra Alexandra Sixto, Directora académica y de tesis

Prof. Titular Dra Mariela Pistón, Directora de tesis

Desarrollo de un material de referencia certificado de yerba mate para determinaciones de arsénico, cadmio, fósforo, plomo y sodio

Qco. Ramiro Pérez Zambra

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2025

Directora académica y de tesis

Prof. Agregada Dra. Alexandra Sixto,

Área de Química Analítica (DEC), Facultad de Química, Universidad de la República

Directora de tesis

Prof. Titular Dra. Mariela Pistón

Área de Química Analítica (DEC), Facultad de Química, Universidad de la República



Facultad
de Química
UDELAR - Uruguay

ACTA DEFENSA DE TESIS

V 03.
2025/01/27

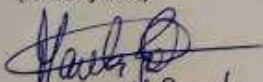
CARRERA DE POSGRADO	Maestría en Química		
ESTUDIANTE	NOMBRE:		C.I.
	Ramiro Pérez Zambra		4.590.340-5
DEFENSA	LUGAR	FECHA	HORA
	Facultad de Química	18/12/2025	10:00
TÍTULO DE TESIS	Desarrollo de un material de referencia certificado de yerba mate para determinaciones de arsénico, cadmio, fósforo, plomo y sodio		
DICTAMEN ¹	CALIFICACIÓN	Excelente	

JUSTIFICACIÓN

La tesis presentada por el Qco. Ramiro Pérez Zambra constituye un trabajo de muy alta calidad académica y científica, abordando una problemática relevante la generación de un Material de Referencia Certificado para la determinación de Pb, P, As, Na, Cd en yerba mate. El trabajo demuestra un sólido dominio de la química analítica y la metrología química, evidenciado en el desarrollo, validación y aplicación de metodologías analíticas, así como en la correcta estimación de la incertidumbre con una muy adecuada revisión bibliográfica. La estrategia experimental es rigurosa, coherente y exhaustiva, incluyendo estudios de homogeneidad, estabilidad, caracterización y un estudio interlaboratorio internacional, lo que refuerza notablemente la robustez de los resultados obtenidos. En conjunto, la tesis representa un aporte original y pionero, con impacto directo en la calidad analítica, la inocuidad alimentaria y la infraestructura de la calidad. La presentación oral fue adecuada, logrando un equilibrio en el contenido y el tiempo de presentación. El estudiante ha contestado adecuadamente las preguntas del tribunal cumpliendo ampliamente con los requisitos exigidos por la Facultad de Química para la obtención del título de magister. Por lo anterior se otorga la calificación de Excelente

DIRECTORES DE TESIS

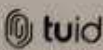
(nombres y firmas)


H. Pistón

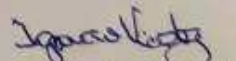

Alexandre Soto.

TRIBUNAL

(nombres y firmas originales en la misma hoja)


FIRMA DIGITAL
María Lucía Pareja Pareira


Dr. Joel Casanova


Ignacio Viñez

¹ La Tesis podrá resultar:

- a) Aprobada con los siguientes conceptos: Excelente (E); Muy Bueno (MB); Bueno (B); Aceptable (A)
b) Reprobada con los siguientes conceptos: Insuficiente (I); Muy Insuficiente (MI)

Resumen

La presente tesis presenta el desarrollo de un Material de Referencia Certificado (MRC) de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) para la determinación de arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb), fósforo (P) y sodio (Na); elementos de alta relevancia tanto por su impacto en la inocuidad alimentaria, como por su interés nutricional y regulatorio. Este desarrollo surge ante la ausencia de un MRC específico de elementos en yerba mate a nivel nacional e internacional, lo cual representa una limitación significativa para los laboratorios que deben garantizar la exactitud y la comparabilidad de resultados en el control de calidad de este producto, ampliamente consumido tanto a nivel local como en el exterior.

El objetivo principal fue producir un MRC, con suficiente grado de homogeneidad, estable, con valores asignados trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI); para así poder ser utilizado como herramienta de control y validación de métodos analíticos, en la determinación de elementos en yerba mate y otras matrices vegetales complejas y similares.

El trabajo comprendió diversas etapas críticas: la selección del material de partida, la molienda, la homogeneización del lote candidato, el envasado bajo condiciones controladas y la evaluación de la carga microbiana, asegurando la integridad del material durante su almacenamiento. Posteriormente se realizaron los estudios de homogeneidad, estabilidad a corto plazo (condiciones de transporte) y estabilidad a largo plazo.

Para realizar las determinaciones de elementos se desarrollaron y validaron métodos específicos de alta exactitud: determinación de Cd y Pb mediante dilución isotópica con detección por ICP-SFMS; determinación de As mediante adición estándar gravimétrica en un punto con estándar interno, con detección por ICP-SFMS;

determinación de P y Na mediante adición estándar gravimétrica en un punto con detección por ICP-AES.

Las cifras de mérito obtenidas en la validación confirmaron que los métodos cumplen con las exigencias metroológicas para la certificación de materiales de referencia, con incertidumbres muy bajas lo cual demuestra la gran exactitud de los mismos.

Los estudios de homogeneidad demostraron que la variabilidad entre frascos fue estadísticamente no significativa, mientras que los ensayos de estabilidad confirmaron la conservación de las propiedades del material bajo condiciones de almacenamiento y transporte simuladas. La evaluación de la incertidumbre expandida ($k = 2$) mostró valores relativos entre 4,5% y 17,5%, dependiendo del elemento, siendo la caracterización y la homogeneidad la principal fuente de incertidumbre.

Se realizó un estudio interlaboratorio internacional con la participación de 14 laboratorios de América, África, Asia y Europa, en el marco del Sistema Interamericano de Metrología (SIM). Los resultados del análisis estadístico mostraron valores de $|d|/U(d_i) < 1$, indicando concordancia entre los valores informados y el valor de referencia, confirmando la exactitud de los métodos desarrollados para As, Cd, P y Na.

Con el MRC producido se llevó a cabo una ronda de Ensayo de Aptitud, destinado a evaluar el desempeño de distintos laboratorios de análisis en la determinación de los elementos de interés. En base a los resultados obtenidos, los laboratorios podrán confirmar la adecuación al uso de sus metodologías o tomar las acciones correctivas necesarias para ajustarlas.

El MRC obtenido representa un aporte pionero a nivel internacional, al constituir el primer material certificado de elementos en yerba mate diseñado para el control de contaminantes metálicos y elementos nutricionales. Este producto podrá ser utilizado

por laboratorios de análisis, académicos e industriales, contribuyendo a la comparabilidad internacional de resultados, armonización de métodos analíticos y el fortalecimiento de la infraestructura de la calidad. Asimismo, su desarrollo sienta las bases para la producción de nuevos MRCs en matrices alimentarias locales, con enfoque en seguridad alimentaria, comercio internacional y salud pública.

Development of a yerba mate certified reference material for the determination of arsenic, cadmium, phosphorus, lead and sodium

Qco. Ramiro Pérez Zambra

Postgraduate program, Faculty of Chemistry

Universidad de la República

2025

Thesis Tutor and Director

Associate Professor Dr. Alexandra Sixto,

Área de Química Analítica (DEC), Facultad de Química, Universidad de la República

Thesis Director

Full Professor Dr. Mariela Pistón

Área de Química Analítica (DEC), Facultad de Química, Universidad de la República

Abstract

The present dissertation describes the development of a Certified Reference Material (CRM) of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) for the determination of arsenic, cadmium, lead, phosphorus, and sodium, elements of high relevance due to their impact on food safety as well as their nutritional and regulatory importance. This development stems from the lack of a specific CRM for determination of elements in yerba mate at both the national and international levels. This represents a significant limitation for laboratories that must ensure the accuracy and comparability of results, in this widely consumed product, both domestically and abroad.

The primary objective was to develop a Certified Reference Material (CRM) exhibiting adequate homogeneity and stability, with assigned values traceable to the International System of Units (SI), so that it could serve as a tool for quality control and validation of analytical methods applied to the determination of elements in yerba mate and other complex plant matrices.

The work comprised several critical stages: selection of the starting material, grinding, homogenization of the candidate batch, packaging under controlled conditions, and assessment of microbial load to ensure the integrity of the material during storage. Subsequently, studies on homogeneity, short-term stability (transport conditions), and long-term stability were conducted.

For the determination of elements, specific high-accuracy methods were developed and validated: determination of Cd and Pb by isotope dilution with detection by ICP-SFMS; determination of As by single-point gravimetric standard addition with an internal standard and detection by ICP-SFMS; and determination of P and Na by single-point gravimetric standard addition with detection by ICP-AES.

The figures of merit obtained during validation confirmed that the methods meet the metrological requirements for the certification of reference materials, showing very low uncertainties and thus demonstrating their high accuracy.

Homogeneity studies indicated that the variability among bottles was statistically insignificant, while stability tests confirmed the preservation of the material's properties under simulated transport conditions and storage. The evaluation of the expanded uncertainty ($k = 2$) yielded relative values ranging from 4.5% to 17.5%, depending on the element, with characterization and homogeneity identified as the main sources of uncertainty.

An international interlaboratory study was carried out with the participation of 14 laboratories from the Americas, Africa, Asia, and Europe, within the framework of the Inter-American Metrology System (SIM). The statistical analysis results showed $|d|/U(d_i) < 1$, indicating agreement between the informed values and the reference values, confirming the accuracy of the methods developed for As, Cd, P, and Na.

Using the produced CRM, a round of proficiency testing was carried out to evaluate the performance of different analytical laboratories in the determination of the elements of interest. Based on the results obtained, the laboratories will be able to confirm the fitness for purpose of their methodologies or take the necessary corrective actions to improve them.

The obtained CRM represents a pioneering contribution at the international level, as it constitutes the first certified material for the determination of elements in yerba mate, designed for the control of both, toxic and nutritional elements. This product can be used by analytical, academic, and industrial laboratories, contributing to the international comparability of results, the harmonization of analytical methods, and

the strengthening of quality infrastructure. Furthermore, its development lays the groundwork for the production of new CRMs in local food matrices, with an emphasis on food safety, international trade, and public health.

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a Elizabeth Ferreira, Jefa del Departamento de Metrología Química del LATU, impulsora inicial de mis estudios de posgrado. Su confianza en mí para desarrollar un área prácticamente desde cero, junto con la libertad científica que me otorgó, fueron fundamentales para dar inicio a este camino.

A la Dra. Mariela Pistón, Directora de tesis, gracias por aceptar acompañarme en este desafío, por tus valiosos consejos y por compartir conmigo tu conocimiento y experiencia a lo largo de todo el proceso.

A la Dra. Alexandra Sixto, Directora académica y de tesis, quien me guió con dedicación y paciencia y se convirtió en un pilar esencial en el desarrollo de esta tesis. Gracias por comprender que necesitaba recorrer otros caminos antes de poder concluir este, por tu apoyo constante, compromiso y generosidad hasta el último día.

A los miembros del tribunal: Dra. Lucía Pareja, Dra. María Noel Cabrera y Dr. Ignacio Vieitez, por su disposición a evaluar esta tesis.

A mis compañeros del Departamento de Metrología Química del LATU, en especial a mi “compa” Romina, con quien compartí incontables horas de trabajo en el laboratorio y a quien embarqué en el desafío de desarrollar el primer material de referencia certificado de elementos en yerba mate. Agradezco también a Gimena y Cecilia por su colaboración en la etapa final del trabajo, y por supuesto, a Simone, por su amistad y apoyo incondicional.

A todos mis colegas del LATU que, de una u otra forma, contribuyeron en este proceso, en particular a los Departamentos de Espectrometría Atómica y de Materiales, por su colaboración y compañerismo.

A las autoridades del LATU, por reconocer la relevancia de este proyecto y por brindarme la posibilidad de realizar esta Maestría con recursos completamente provistos por la Institución.

Finalmente, a todos los colegas metrologos que tuve el privilegio de conocer a lo largo de este recorrido, provenientes de diversas partes del mundo: gracias por sus aportes, por compartir generosamente sus conocimientos y por enriquecer mi formación. En especial, deseo agradecer a Edith Valle y María del Rocío Arvizu, del Centro Nacional de Metrología de México, y a Lu Yang, del National Research Council de Canadá, por introducirme al mundo de la espectrometría de masas de alta resolución y de la dilución isotópica.

A todas las personas mencionadas y a muchas otras que me acompañaron de distintas maneras, gracias.

Tabla de Contenidos

Resumen.....	V
Abstract.....	IX
Agradecimientos.....	XII
Lista de Tablas	XVII
Lista de Figuras	XIX
Lista de abreviaturas y siglas	21
CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN	22
1.1 Hipótesis.....	26
1.2 Objetivo General	27
1.3 Objetivos Específicos.....	27
CAPÍTULO II – MARCO TEÓRICO.....	28
2.1 Material de Referencia Certificado.....	28
2.2 Dilución isotópica.....	31
2.3 Método de cuantificación por adición estándar gravimétrico en un punto.....	34
2.4 Espectrometría de masas de sector magnético con plasma acoplado inductivamente	37
2.5 Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente	43
2.6 Digestión de muestras asistida por microondas	47
3.1 Equipos	51
3.2 Reactivos y disoluciones.....	52
3.3 Materiales de Referencia Certificados	53
3.4 Selección del material de partida.....	53
3.5 Determinación de humedad en el candidato a MRC	54
3.6 Determinación de la carga microbiológica en el candidato a MRC	54
3.7 Procedimiento desarrollado para la determinación de cadmio y plomo por ID-ICP-SFMS	54

3.8 Procedimiento desarrollado para la determinación de arsénico por SA-ICP-SFMS ...	58
3.9 Procedimiento desarrollado para la determinación de fósforo y sodio por SA-ICP-AES	
60	
3.10 Validación analítica de los métodos.....	61
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
4.1 Preparación del candidato a Material de Referencia.....	64
4.1.2 Molienda.....	64
4.1.2.1 Elección del molino	64
4.1.2.2 Optimización de las condiciones de molienda.	65
4.1.4 Envasado.....	68
4.1.5 Control de la carga microbiana	68
4.2 Optimización del tratamiento de muestra	68
4.2.1 Consideraciones preliminares	68
4.2.2 Tratamiento de muestra para determinación de Arsénico	70
4.2.2.1 Diseño de experimentos	72
4.2.2.2 Determinación de carbono residual por ICP-SFMS.....	74
4.3 Desarrollo de la metodología para la determinación de cadmio y plomo por método dilución isotópica con detección por ICP-SFMS	81
4.3.1 Selección de isótopos para cadmio	82
4.3.2 Selección de isótopos para plomo.....	86
4.3.3 Corrección de interferencias	87
4.3.4 Determinación de las relaciones isotópicas de plomo en las muestras	89
4.3.5 Ecuación de cálculo método de dilución isotópica en dos etapas.....	92
4.3.6 Evaluación de la incertidumbre	93
4.3.6.1 Cadmio	93
4.3.6.2 Plomo.....	96
4.3.7 Evaluación del desempeño del método	98
4.4 Desarrollo de la metodología para la determinación de arsénico por método de adición estándar con estándar interno con detección por ICP-SFMS	99

4.4.1 Selección del estándar interno.....	100
4.4.2 Adición de calibrante	100
4.4.3 Ecuación de cálculo método de adición estándar en un punto con estándar interno.	101
4.4.5 Evaluación de la incertidumbre	101
4.4.6 Evaluación del desempeño del método	102
4.5 Desarrollo de la metodología para la determinación de fósforo y sodio por método de adición estándar con detección por ICP-AES	104
4.5.1 Elección de no utilizar estándar interno	104
4.5.2 Selección de las longitudes de onda de medición	105
4.5.3 Uso de cloruro de cesio como buffer de ionización	106
4.5.4 Ecuación de cálculo adición estándar en un punto.....	107
4.5.5 Evaluación del desempeño del método	107
4.6 Evaluación de la homogeneidad del lote.....	109
4.7 Evaluación de la estabilidad del lote en condiciones de transporte	113
4.8 Estudio de estabilidad a largo plazo	115
4.9 Estudio Interlaboratorio	116
4.9.1 Participantes.....	119
4.9.2 Resultados informados	120
4.9.3 Estimación del valor de referencia.....	122
4.9.4 Evaluación de la performance de los métodos desarrollados.....	126
4.10 Asignación del valor al MRC.....	127
4.11 Estimación de la incertidumbre del MRC.....	132
4.12 Organización de un Ensayo de Aptitud.....	134
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	137
CAPÍTULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
CAPÍTULO VII ANEXOS	147
7.1 Trabajos presentados en eventos científicos	147
7.2 Trabajos publicados en revistas científicas	154

Lista de Tablas

Tabla 1 - Comparación de técnicas de medición y métodos de evaluación del sesgo en la determinación de elementos en yerba mate.	25
Tabla 2 - Programa de digestión de muestras - Presión máxima 60 bar. Temperatura máxima: 220 °C.	55
Tabla 3 - Condiciones operativas para la determinación de Cd y Pb por ICP-SFMS.....	57
Tabla 4 - Condiciones operativas para la determinación de As por ICP-SFMS	59
Tabla 5 - Condiciones operativas para la determinación de Na y P por ICP-AES.....	61
Tabla 6 - Diseño de experimentos y resultados carbono residual	78
Tabla 7 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{112}Cd y ^{114}Cd , Adaptado (Finnigan MAT 1995).....	83
Tabla 8 – Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{106}Cd y ^{108}Cd , Adaptado (Finnigan MAT 1995).....	85
Tabla 9 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{110}Cd y ^{111}Cd , Adaptado (Finnigan MAT 1995).....	85
Tabla 10 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{113}Cd y ^{116}Cd , Adaptado (Finnigan MAT 1995).....	86
Tabla 11 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{204}Pb y ^{206}Pb , Adaptado (Finnigan MAT 1995).....	87
Tabla 12 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{207}Pb y ^{208}Pb , Adaptado (Finnigan MAT 1995).....	87
Tabla 13 - Resultados de la corrección matemática de interferencias asociadas al óxido de molibdeno sobre las muestras y MRCs	89
Tabla 14 – Resultado abundancias y pesos atómicos en las muestras y MRCs.....	91
Tabla 15 - Cifras de mérito del método desarrollado para la determinación de Cd.....	98
Tabla 16 - Cifras de mérito del método desarrollado para la determinación de Pb	99
Tabla 17 - Estimación de la incertidumbre de la fracción de masa de As en candidato A MRC según (JCGM 100 2008).....	102
Tabla 18 - Cifras de mérito método desarrollado para As.....	103
Tabla 19 - Cifras de mérito método desarrollado para P	108
Tabla 20 - Cifras de mérito método desarrollado para Na	109
Tabla 21 - Resultado del ANOVA para la evaluación de la homogeneidad.....	113
Tabla 22 – Resultados del estudio de estabilidad a corto plazo (condiciones de transporte)	114
Tabla 23 - Resultados estudio de estabilidad a largo plazo.....	115
Tabla 24 - Participantes del estudio interlaboratorio	119
Tabla 25 – Resultados de la evaluación de la homogeneidad, simetría y normalidad de los resultados y valor de consenso obtenido en la Intercomparación	125

Tabla 26 - Evaluación de la performance de los métodos desarrollados a partir del Interlaboratorio *Valores expresados en base seca.....	126
Tabla 27 - Resultados valor de consenso Intercomparación para caracterización del MRC .	129
Tabla 28 - Valor de caracterización del MRC e incertidumbre asociada.	132
Tabla 29 - Presupuesto de incertidumbre final del MRC.....	133
Tabla 30 - Resumen de la evaluación del desempeño de los laboratorios participantes del Ensayo de Aptitud.....	135

Lista de Figuras

Figura 1 - Dilución isotópica en dos etapas con igualación de las relaciones isotópicas	33
Figura 2 - Esquema ICP-SFMS Thermo Fisher Scientific modelo Element 2 Adaptado de (Thermo Fisher Scientific 2009)	40
Figura 3 - Resoluciones necesarias para resolver interferencias típicas en ICP-MS (Jakubowski, Moens e Vanhaecke 1998)	42
Figura 4 - Ejemplo de diseño óptico de un ICP-AES secuencial (Skoog, Holler e Crouch 2018).....	44
Figura 5 - ICP-AES PerkinElmer Optima 7000 DV. Departamento de Metrología Química, LATU.....	45
Figura 6 - Ejemplo de diseño óptico de un ICP-AES simultáneo (Skoog, Holler e Crouch 2018).....	46
Figura 7 - Esquema de microondas de tipo cavidad (de Oliveira 2003).....	49
Figura 8 - Microondas de cavidad utilizado en la tesis (Anton Paar GmbH 2019).....	49
Figura 9 - Digestos en proceso de evaporación	55
Figura 10 - Residuo luego de la evaporación	56
Figura 11 - Molino ultracentrífugo Retsch ZM 200.....	65
Figura 12 - Muestra quemada por sobrecalentamiento	66
Figura 13 - Muestra sin signos de degradación.....	67
Figura 14 - Mezclador tipo pantalón, LATU	68
Figura 15 - Digestión de muestra sin HF.....	69
Figura 16 - Comparación resultados obtenidos procesando $^{12}\text{C}^+$ y $^{13}\text{C}^+$	76
Figura 17 - Grafico de Bland-Altman para comparación de resultados de carbono residual cuantificando con $^{12}\text{C}^+$ y $^{13}\text{C}^+$	77
Figura 18 - Resultados del análisis de regresión del diseño de experimentos	79
Figura 19 - Contorno de la superficie de respuesta: optimización de la digestión con masa de muestra 1 g	81
Figura 20 - Ecuaciones de cálculo de las abundancias isotópicas del Pb.....	91
Figura 21 - Estimación de la incertidumbre de la fracción de masa de Cd en candidato A MRC por método Kragten.....	94
Figura 22 -Resultados estimación de la incertidumbre por método de Monte Carlo para la determinación de Cd en la muestra candidato a MRC	95
Figura 23 - Estimación de la incertidumbre de la fracción de masa de Cd en candidato a MRC por método Kragten.....	97
Figura 24 - Representación gráfica de la prueba de Tukey para valores anómalos en los resultados de Pb para evaluación de la homogeneidad	110
Figura 25 - Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de As en el candidato a MRC.....	111
Figura 26 - Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de Cd en el candidato a MRC.....	111

Figura 27 - Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de P en candidato a MRC	112
Figura 28 – Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de Pb en candidato a MRC.....	112
Figura 29 – Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de Na en candidato a MRC.....	113
Figura 30 - Resultados reportados para fracción de masa de Arsénico (Pérez Zambra, et al. 2025).....	120
Figura 31 - Resultados reportados para fracción de masa de Cd (Pérez Zambra, et al. 2025)	120
Figura 32 - Resultados reportados para fracción de masa de P (Pérez Zambra, et al. 2025) .	121
Figura 33 - Resultados reportados para fracción de masa de Na (Pérez Zambra, et al. 2025)	121
Figura 34 - Árbol de decisión. Adaptado (Possolo, et al. 2021).....	122
Figura 35 - Comparación de resultados para caracterización de As en el MRC	130
Figura 36 - Comparación de resultados para caracterización de Cd en el MRC.....	130
Figura 37 - Comparación de resultados para caracterización de Na en el MRC.....	131
Figura 38 - Comparación de resultados para caracterización de P en el MRC.....	131

Lista de abreviaturas y siglas

BIPM	Buró Internacional de Pesas y Medidas
CCQM	Comité Consultativo de Cantidad de Materia
EC	Calibración Externa
ID	Dilución Isotópica
FAAS	Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización por Llama
GFAAS	Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización por Horno de Grafito.
ICP-AES	Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
ICP-MS/MS	Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo en Tándem
ICP-QMS	Espectrometría de Masas de Cuadrupolo Simple con Plasma Acoplado Inductivamente
ICP-SFMS	Espectrometría de Masas de Sector Magnético con Plasma Acoplado Inductivamente
IS	Estándar interno
ISO	Standard Organization for Standarization
JCGM	Joint Committee for Guides in Metrology
LATU	Laboratorio Tecnológico del Uruguay
MERCOSUR	Mercado Común del Sur
MRC	Material de Referencia Certificado
SA	Adición Estándar
SI	Sistema Internacional de Unidades
TIMS	Espectrometría de masas con ionización térmica

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae) es una planta originaria del cono sur de América, especialmente del sur de Brasil, noreste de Argentina, este de Paraguay y Uruguay. Su consumo se remonta a los pueblos indígenas guaraníes, quienes la consideraban una planta fundamental y ya la utilizaban, previo a la colonización española (Heck y De Mejia 2007) (Kujawska 2018).

Hoy en día el consumo de yerba mate ha trascendido ampliamente las fronteras de Sudamérica, gracias a las dinámicas de migración transnacional. Por ejemplo, su presencia se consolidó en Medio Oriente, especialmente en Siria y Líbano, países que actualmente se encuentran entre los principales importadores y consumidores fuera de América del Sur (Folch 2010). En Europa y América del Norte, el consumo de yerba mate ha experimentado un crecimiento, impulsado por el interés en bebidas naturales con propiedades funcionales (Samoggia, Landuzzi y Vicién 2021).

Brasil y Argentina son los principales exportadores de yerba mate, con exportaciones que en 2024 alcanzaron los 102,7 y 82,55 millones de dólares, respectivamente. Uruguay, en el mismo año, exportó por un valor de 11,08 millones de dólares y Paraguay por un valor de 11,04 millones de dólares (Mendoza, Statista 2025).

En cuanto al consumo interno, Uruguay presenta el mayor consumo per cápita de yerba mate del mundo, con 8,64 kg/habitante/año reportados en 2018. Le siguen Argentina (6,5 kg), Paraguay (2,5 kg) y Brasil (0,8 kg) (Mendoza, Statista, 2020).

Los efectos tóxicos del As, Cd y Pb han sido extensamente estudiados (Nordberg y Costa 2022). Por ello, el MERCOSUR establece límites máximos permitidos en yerba mate: 0,6 mg/kg para As y Pb, y 0,4 mg/kg para Cd (MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11, 2013). En Uruguay, el Decreto 14/013 adopta dicha normativa.

El origen de estos contaminantes no está claramente determinado. Según (Pardinho, y otros 2018), el Pb podría provenir del material particulado en el aire; el Cd, del uso de pesticidas; y el arsénico, del suelo o del agua de riego. Alternativamente, se ha propuesto que la presencia de estos elementos pudiese originarse en el uso de fertilizantes fosfatados (Nziguheba y Smolders 2008).

Adicionalmente, la normativa vigente en materia de etiquetado nutricional, Decreto 117/006, exige que el contenido de Na en los alimentos sea determinado e informado explícitamente en el envase del producto.

La determinación de estos analitos en yerba mate presenta numerosos desafíos analíticos, debido a la complejidad de la matriz, la variabilidad en las concentraciones y las interferencias que afectan las mediciones.

Los Materiales de Referencia Certificados (MRC) representan la herramienta más confiable para garantizar la validez de los resultados analíticos emitidos por los laboratorios. Su uso permite evaluar el desempeño del proceso analítico en su totalidad, validar los métodos utilizados y asegurar la trazabilidad y confiabilidad de los resultados.

Un MRC es un material cuyas propiedades han sido caracterizadas mediante procedimientos validados, acompañado de un certificado que indica los valores de referencia, la incertidumbre asociada y su trazabilidad metrológica. Debe cumplir con requisitos de homogeneidad, estabilidad temporal y estabilidad durante el transporte (ISO 17034 2016).

A la fecha no existe un MRC específico de elementos en yerba mate a nivel nacional ni internacional, lo cual representa una limitación para los laboratorios que realizan análisis de este producto. El desarrollo de un MRC para yerba mate contribuiría de

forma significativa a mejorar la calidad de los resultados analíticos, tanto desde la perspectiva de la inocuidad alimentaria como del sector productivo.

En ausencia de un MRC de yerba mate, los laboratorios suelen recurrir a estrategias alternativas para la evaluación del sesgo, como la fortificación de muestras. Si bien este enfoque es ampliamente utilizado, presenta limitaciones relevantes. En primer lugar, dado que generalmente se desconoce la forma química en la que el analito se encuentra en la muestra, la adición del estándar podría realizarse en una especie química que no se comporte de manera equivalente al analito ya presente, durante el procedimiento analítico aplicado. Esto puede conducir a estimaciones inexactas de la recuperación y, por tanto, del sesgo. Además, la fortificación únicamente permite identificar interferencias de tipo multiplicativo, pero no aquellas de carácter aditivo, lo que compromete aún más la capacidad de esta metodología de evaluación del sesgo para detectar posibles errores sistemáticos.

Otra alternativa utilizada es el análisis paralelo con MRCs de otros materiales vegetales. Sin embargo, estudios preliminares indican que la yerba mate, debido a su alto contenido de sílice, presenta un comportamiento diferente al de otras matrices vegetales.

A continuación, se presentan, en la Tabla 1, las estrategias de cuantificación y de evaluación del sesgo en determinación de elementos en yerba mate en publicaciones recientes.

Publicación	Técnica de medición	Estrategia para evaluación del sesgo
(Alexandre Marcelo, et al. 2014)	ICP-AES ICP-QMS	Adición de estándar pre-digestión
(Gobbo dos Santos, et al. 2017)	ICP-QMS	Adición de estándar
(Camotti Bastos, et al. 2018)	FAAS	No indica
(Pardinho, y otros 2018)	ICP-QMS	NIST SRM 1575a - Pine needle
(Pereira Schmite, y otros 2019)	GFAAS	Adición de estándar pre-digestión
(Valduga, Gonçalves e Magri 2019)	ICP-QMS	Material de referencia en matriz vegetal, no especificado.
(Magari, y otros 2021)	ICP-AES, GFAAS	GBW 10052 - Camellia sinensis
(Martín, y otros 2023)	ICP-QMS	No indica
(Panzl, et al. 2025)	ICP-AES, ICP-QMS	NIST SRM 1515 – Apple leaves

Tabla 1 - Comparación de técnicas de medición y métodos de evaluación del sesgo en la determinación de elementos en yerba mate.

La calidad de los resultados analíticos tiene un impacto directo en la toma de decisiones. Un resultado incorrecto puede derivar en el rechazo o la aceptación indebida de un lote, con consecuencias tanto para la salud pública como para el sector productivo, en una industria que mueve decenas de millones de dólares. Contar con herramientas que garanticen la confiabilidad analítica es esencial, tanto para garantizar la inocuidad alimentaria, como para evitar pérdidas económicas.

El desarrollo de métodos avanzados y MRCs trazables al Sistema Internacional de Unidades permitirá avanzar hacia una legislación más robusta, una mejor protección del consumidor y un comercio internacional más justo, basado en mediciones confiables y comparables.

1.1 Hipótesis

Se plantea que es posible producir un lote de MRC de yerba mate que cumpla con los requisitos metrológicos para ser clasificado como tal y que resulte viable para su disponibilidad y uso por laboratorios que determinen As, Cd, Na, P y Pb en esta matriz vegetal.

Asimismo, se postula que la fracción de masa de los elementos seleccionados constituye un parámetro independiente del método de medición. En consecuencia, la caracterización del MRC podrá realizarse mediante: (i) el desarrollo y validación de un método primario basado en dilución isotópica, o bien (ii) la combinación de resultados obtenidos por métodos de elevada exactitud y los resultados de un estudio interlaboratorio.

Por tanto, en el trabajo de investigación de esta tesis será necesario desarrollar métodos de cuantificación con el grado de exactitud que permita la caracterización del material y puedan, a su vez, ser reproducidos por otros laboratorios, ya sea con fines de investigación, así como también de prestación de servicios analíticos.

Los elementos en estudio presentan diferentes desafíos analíticos desde el punto de vista de su determinación. Son elementos de distintos grupos. El As es un semimetal monoisotópico que se encuentra en una fracción de masa de niveles de partes por billón. El Cd y el Pb son metales de transición polisotópicos. El Na es un metal alcalino monoisotópico, fácilmente ionizable y comparativamente con otras matrices se encuentra a niveles de concentración bajo. El P es un no metal monoisotópico con un alto potencial de ionización.

A pesar de estas diferencias, se espera que, mediante un abordaje amplio, utilizando diferentes técnicas analíticas y métodos de cuantificación, se podrá centrar la investigación en obtener una exactitud que permita lograr los objetivos planteados.

La hipótesis se podrá demostrar si se logra un lote de MRC con la concentración de al menos alguno de los elementos certificada y con una incertidumbre adecuada al propósito.

1.2 Objetivo General

Generación de un material de referencia certificado de yerba mate para su aplicación en determinaciones de elementos que permitan garantizar la confiabilidad de los análisis de As, Cd, Pb, Na y P en este producto de consumo masivo.

1.3 Objetivos Específicos

- Estudio y optimización de condiciones de molienda, mezclado y embotellado del material de partida a los efectos de generar un lote que cumpla con las propiedades de homogeneidad y estabilidad en condiciones de transporte del material.
- Desarrollo y validación de un método para la determinación de Cd y Pb en yerba mate por dilución isotópica con detección por espectrometría de masas de sector magnético con plasma acoplado inductivamente (ICP-SFMS).
- Desarrollo y validación de métodos para la determinación de As, Na y P en yerba mate basados en detección por técnicas como ICP-SFMS y espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES).
- Generación del informe de certificación del lote.

CAPÍTULO II – MARCO TEÓRICO

2.1 Material de Referencia Certificado

El inicio del desarrollo y producción de materiales de referencia tiene como orígenes finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX, coincidiendo con un marcado crecimiento de la producción industrial, donde surge una necesidad cada vez mayor de herramientas que respaldaran la validez de los resultados de los ensayos químico-analíticos. En respuesta a esta demanda, el National Bureau of Standards (NBS) de los Estados Unidos desarrolló en 1906 los primeros materiales de referencia de hierro fundido. Pocos años después, en 1912, la Oficina Real de Ensayos de Materiales en Berlín-Dahlem -Institución precursora del actual Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)-, emitió el primer acero estándar destinado a la determinación de carbono. Paralelamente, en 1916, el Reino Unido inició su propia producción de materiales de referencia a través del programa British Chemical Standards (BCS). Posteriormente, en 1922, se sumó Francia con la creación de la Société Française des Échantillons-Type, consolidando así los primeros esfuerzos en la estandarización de materiales para fines analíticos. Como podemos observar, el progreso tecnológico ha conllevado a nuevos desafíos analíticos que requieren del desarrollo de materiales de referencia certificados. (Recknagel, y otros 2022).

“Un material de referencia (MR) es un material suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades especificadas (cualitativas o cuantitativas), las cuales han sido establecidas para ser adecuadas al uso para un procedimiento de medición” (ISO GUIDE 30 2015).

“Los materiales de referencia certificados (MRC) son materiales de referencia cuyas propiedades han sido caracterizadas mediante procedimientos metrológicamente válidos, los cuales se encuentran acompañados de un certificado que provee el valor

de la/s propiedad/es específica/s, su incertidumbre asociada y una declaración de la trazabilidad metrológica” (ISO GUIDE 30 2015).

En el campo de las ciencias analíticas, la exactitud y comparabilidad de los resultados de medición constituyen pilares fundamentales para la toma de decisiones basadas en evidencia, tanto en contextos regulatorios como en investigación.

En este escenario, los Materiales de Referencia Certificados (MRC) juegan un rol esencial para: la evaluación de la veracidad y/o exactitud de los resultados analíticos, establecer la trazabilidad metrológica de los resultados de medición, la validación de métodos analíticos, la evaluación del desempeño de laboratorios (control de calidad interno y externo), la calibración de instrumentos de medición y la asignación de valores a otros MR/MRC (ISO 17034, 2016).

La certificación de un material implica un proceso riguroso que abarca desde la selección y preparación del material, estudios de homogeneidad y estabilidad, y la caracterización mediante métodos validados con resultados trazables al SI. Esta información es documentada en un certificado que proporciona al usuario confianza en el valor asignado y en su aplicabilidad para fines específicos (ISO 17034 2016).

La caracterización se suele realizar empleando técnicas y métodos analíticos que representen el estado del arte para realizar la mejor estimación posible del “valor verdadero”. A medida que los métodos analíticos y la comprensión de los sistemas de medición evolucionan con el tiempo se pueden producir nuevos resultados, con mayor exactitud, reduciendo su incertidumbre (Recknagel, et al. 2022).

Desde el punto de vista metrológico, los MRC contribuyen a establecer cadenas de trazabilidad en las mediciones químicas. La trazabilidad metrológica es la propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada

una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida (De Bièvre, et al. 2011) (JCGM 200:2012).

En los últimos años, la evolución en la aplicación de la norma ISO/IEC 17025 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración” ha impulsado un creciente requerimiento del uso de distintos tipos de Materiales de Referencia Certificados (MRC) en el análisis químico, lo que también ha dado lugar a un aumento en las publicaciones sobre el desarrollo y certificación de nuevos MRC (Olivares, et al. 2018).

El desarrollo y uso de MRC es clave para asegurar la calidad de los resultados analíticos en sectores críticos como el control alimentario, farmacéutico, ambiental, salud, forense e industrial. Su importancia ha crecido de manera proporcional al incremento de exigencias regulatorias a nivel internacional, especialmente aquellas impuestas por organismos que exigen pruebas documentadas de trazabilidad y exactitud.

Si bien el uso MRC es de vital importancia, su disponibilidad aún no cubre toda la demanda de los laboratorios (Nogueira 2015). Principalmente en sectores especializados o regiones con infraestructura limitada. Esto resalta la urgencia de ampliar el desarrollo y la distribución de MRC adaptados a las necesidades, las demandas analíticas emergentes y las particularidades regionales, lo cual se logra fortaleciendo las capacidades institucionales para su desarrollo y producción. De este modo, se promueve una mayor autonomía frente a países productores de MRC y se contribuye a reducir las asimetrías en el comercio global.

2.2 Dilución isotópica

El principio fundamental de la dilución isotópica consiste en añadir una cantidad conocida de un isótopo enriquecido de un determinado elemento a la muestra. Luego de alcanzar el equilibrio isotópico, se mide la relación isotópica resultante entre el isótopo natural y el isótopo enriquecido mediante un espectrómetro de masas. A partir de esta relación, y con el conocimiento de la cantidad añadida del isótopo enriquecido, es posible calcular la fracción de masa del analito (Watters, et al. 1997).

El concepto de dilución isotópica (ID) fue originalmente propuesto en 1913, para la determinación de la solubilidad del sulfuro de plomo usando isótopos radiactivos. Este tipo de aplicación se conoce actualmente como análisis por dilución isotópica radioquímica. Con el auge del desarrollo de la espectrometría de masas, las primeras aplicaciones de dilución isotópica con espectrometría de masas (IDMS) aparecen en la década del 1940s con aplicación en metabolismo de aminoácidos y análisis elemental (Vogl y Pritzkow 2010).

A su vez, la nueva disponibilidad de isótopos estables enriquecidos de muchos elementos, dada por la Comisión de Energía Atómica de los Estados Unidos, impulsó el desarrollo de la IDMS para diversos temas como las razones de ramificación, la geocronología y los rendimientos de fisión (Vogl y Pritzkow 2010).

A partir de la década del 50, con el uso de Espectrometría de masas con ionización térmica (TIMS), que ofrece una alta exactitud en la determinación de relaciones isotópicas, aparecen los primeros trabajos de dilución isotópica con aplicación en determinación de elementos (Hearn, Evans y Sargent 2005).

Para fines de la década de 1970 la dilución isotópica acoplada a TIMS era ya una metodología establecida para estudios en geocronología, química nuclear y certificación de materiales de referencia (Heumann 1982).

Sin embargo, con el desarrollo y disponibilidad de equipos comerciales de ICP-MS, a principios de los años 1990, aparecieron las primeras publicaciones referidas a la aplicación de ID para ICP-MS (Vogl y Pritzkow 2010).

El uso combinado de ID con ICP-MS ha permitido explotar la alta sensibilidad, selectividad y capacidad multielemental de este último. La técnica ICP-MS permite la detección de relaciones isotópicas con una excelente relación señal/ruido, incluso en matrices de gran complejidad, como alimentos, tejidos biológicos, suelos o sedimentos.

Existen diversos enfoques en el modo de aplicación del método ID. Uno de ellos es emplear como isótopo enriquecido un isótopo que se encuentre certificado en su fracción de masa, el cual será adicionado a la muestra. Luego de alcanzado el equilibrio isotópico se determina la relación isotópica y a partir de esta la fracción de masa del analito en la muestra (Vogl y Pritzkow 2010).

Otro enfoque es adicionar una cantidad de isótopo enriquecido a un calibrante certificado en fracción de masa y a la muestra, determinando luego la relación isotópica en las mezclas calibrante + isótopo enriquecido y en la mezcla muestra + isótopo enriquecido. Este segundo enfoque nos permite utilizar un isótopo enriquecido que no sea certificado en fracción de masa, mucho más accesibles en el mercado, y a su vez utilizar cualquier solución calibrante certificada en la fracción de masa. Esta forma de aplicar la ID se la denomina dilución isotópica en dos etapas “*double isotope dilution*” (Vogl y Pritzkow 2010).

Un tercer enfoque es denominado *exact-matching* (Figura 1), el cual es una variante del método de dilución isotópica en dos etapas. Este método implica, a través de una iteración, que las mezclas de calibrante + isótopo enriquecido y de muestra + isótopo enriquecido están exactamente igualadas, es decir, que posean exactamente la misma concentración del isótopo. Idealmente, la relación isotópica entre el isótopo mayoritario del analito y el isótopo mayoritario del isótopo enriquecido en cada

mezcla de muestra o calibrante debería ser igual a 1. Esto puede conducir a incertidumbres muy bajas, ya que los errores sistemáticos en la determinación de las relaciones isotópicas se cancelan bajo condiciones de *exact-matching* (Hearn, Evans y Sargent 2005).

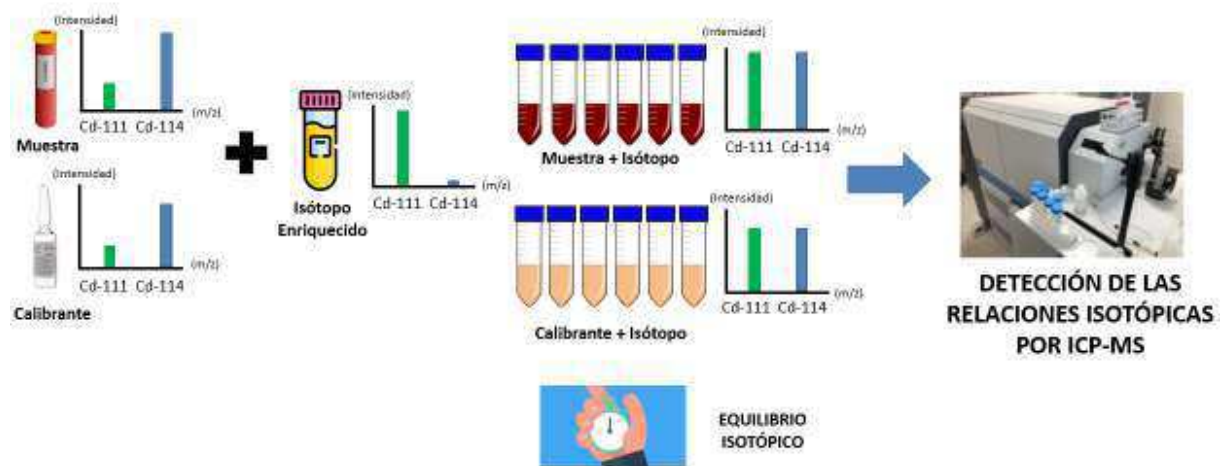


Figura 1 - Dilución isotópica en dos etapas con igualación de las relaciones isotópicas

En la metodología conocida como *multiple-spiking isotope dilution*, la adición no de uno, sino de múltiples isótopos enriquecidos a la muestra, resuelve de manera eficaz el problema de la cuantificación de analitos que se interconvierten (Ouerdane, Mester y Mejia 2009).

El Comité Consultativo de Cantidad de Materia del Buró Internacional de pesas y medidas ha definido el método de dilución isotópica como método primario para determinación de cantidad de materia. “Un método primario de medida es aquel que posee las más altas cualidades metrológicas, cuyo funcionamiento puede describirse y comprenderse completamente, para el cual puede establecerse una declaración completa de incertidumbre en términos de unidades del SI, y cuyos resultados, por lo

tanto, se aceptan sin referencia a un patrón de la magnitud que se mide” (Milton y Quinn 2001).

A diferencia de la columbimetría, la gravimetría y la depresión del punto de congelación, que son métodos primarios directos, la dilución isotópica viene clasificada como “*primary ratio method*”. Si bien puede ser completamente descrita por una ecuación de medida, no puede establecer una conexión con la definición del mol sin el uso de algún otro método primario. A pesar de ello, se considera que un método primario directo puede combinarse con un “*primary ratio method*” y obtener mediciones que conserven sus cualidades primarias (Milton y Quinn 2001).

2. 3 Método de cuantificación por adición estándar gravimétrico en un punto

Si bien la calibración externa en espectrometría atómica es uno de los métodos de cuantificación más difundidos, presenta una serie de desventajas que limitan su aplicabilidad en el análisis de muestras complejas. La principal limitación está asociada al efecto de matriz, dado que las condiciones físico-químicas de la muestra pueden diferir significativamente de las soluciones calibrantes, provocando variaciones en la nebulización, atomización y/o ionización, generando así sesgos en la señal analítica, que se traducen en una menor exactitud de los resultados (Zhu y Chiba 2012).

Por otro lado, el método de adición estándar (SA) es una de las estrategias de calibración utilizada en química analítica, para compensar las interferencias multiplicativas, frecuentemente asociadas a la matriz. Su aplicación tradicional consiste en preparar una serie de soluciones de volumen constante a partir de la muestra problema, a las cuales se le añaden cantidades crecientes de calibrante del analito de interés. De este modo, la matriz de todas las soluciones permanece

constante, variando únicamente la concentración añadida del analito. Al medir la respuesta instrumental de cada solución y extrapolar linealmente los resultados, se determina la concentración original del analito en la muestra (Skoog, Holler y Crouch 2018).

El principal inconveniente asociado con el método de adición estándar tradicional es la necesidad de construir una curva de calibración para cada muestra. Este problema se vuelve especialmente crítico cuando se debe analizar una gran cantidad de muestras, dado que el rendimiento analítico de este método es considerablemente menor al método de calibración externa o al método de igualación de matriz. Además, el método de adición estándar puede volverse ineficaz, cuando la forma química del analito es diferente en la muestra y en el calibrante añadido. Al igual que el método de calibración externa, el método de adición estándar no es adecuado para corregir los efectos traslacionales, que están relacionados con las interferencias espectrales y la señal de fondo y solo afectan la ordenada al origen de la curva de calibración (Carter, et al. 2018).

El uso de estándar interno (IS) en espectrometría atómica se basa en la incorporación de un elemento adicional, con concentración constante, tanto en las muestras como en los calibrantes. La señal de este estándar se emplea como referencia frente a la señal del analito, de manera que la calibración se realiza utilizando la razón señal analito/señal IS, en lugar de la señal absoluta del analito. Este enfoque permite compensar variaciones debidas a fluctuaciones instrumentales, como, por ejemplo: inestabilidades en el sistema de nebulización o inyección de la muestra en el plasma, cambios en la intensidad de la fuente de radiación. La condición fundamental es que el estándar interno experimente los mismos procesos físicos y químicos que el analito durante la medición, de modo que ambos se vean afectados de manera comparable por dichas perturbaciones. Por lo tanto, la correcta selección del estándar interno es un aspecto crítico (Carter, et al. 2018).

El método de adición estándar gravimétrico fue introducido en la década del 2000s, como mejora al método volumétrico. A su vez se combinó con el uso de estándar interno, para superar los inconvenientes asociados con la dilución de la solución de muestra cuando se añade el calibrante. El estándar interno y el calibrante se añaden gravimétricamente a cada matraz que contiene la muestra, con fracciones de masa que varían desde cero hasta un nivel alto de adición. La principal ventaja de este enfoque es que no es necesario un ajuste cuantitativo del volumen, ya que el IS puede corregir los efectos de dilución. Además, si las muestras son homogéneas y tienen una matriz idéntica, no es necesario construir una curva de calibración para cada muestra, y la concentración del analito puede determinarse a partir de la pendiente de una curva construida con el material de referencia certificado. En este caso, la curva de calibración contiene en el eje x la masa de analito añadida por gramo de muestra, y en el eje y la razón de señales analito/IS, multiplicada por la masa de IS por gramo de muestra (Carter, et al. 2018).

Otra ventaja del método gravimétrico es la reducción de costos y tiempo involucrado en mantener el material volumétrico calibrado. Con una única balanza analítica podemos realizar todas las operaciones necesarias para aplicarlo.

Una variante del método de adición estándar gravimétrico con estándar interno implica realizar una única adición a una muestra que contiene el estándar interno. Este método, que ha demostrado niveles de exactitud promisorios, posee varias ventajas: el IS puede estar intrínsecamente presente en la muestra, de ser adicionado no es necesario realizarlo de manera precisa, la ecuación de cálculo es sencilla y no requiere de análisis de regresión, lo cual facilita notablemente la correcta estimación de la incertidumbre (Zhu y Chiba 2012).

La desventaja de este método es la imposibilidad de verificar para cada muestra a ser analizada la respuesta lineal entre la señal analítica y la concentración del analito (Donati y Amais 2019).

2.4 Espectrometría de masas de sector magnético con plasma acoplado inductivamente

Los métodos tradicionales para detección y cuantificación de elementos incluyen técnicas gravimétricas, volumétricas, colorimétricas y espectroscópicas. Entre estos, las técnicas basadas en plasma acoplado inductivamente (ICP) como ICP-MS e ICP-AES se destacan por su alta precisión, exactitud y bajos límites de detección.

Un ICP-SFMS es un sistema de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente y analizador de sector magnético de doble enfoque. En estos instrumentos el espectrómetro de masas utiliza un analizador de campo magnético y un analizador electroestático para separar los iones. Estos analizadores consiguen una resolución superior a los analizadores de simple y triple cuadrupolo, resolviendo interferencias de manera eficaz, sin necesidad de utilizar celdas de colisión/reacción.

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que genera un plasma de argón a temperaturas de hasta 10,000 K. En el plasma, la muestra sufre procesos de desolvatación, vaporización, atomización, excitación y ionización. La energía del plasma es lo suficientemente alta como para superar el potencial de ionización de parte de los átomos presentes, generando iones, que posteriormente serán analizados en el espectrómetro de masas en base a su relación masa/carga (m/z) (Thomas 2013).

En la interfaz entre el ICP y el espectrómetro de masas, los iones generados en el plasma pasan a través de dos conos alineados coaxialmente, el primero llamado

sampler cone y el segundo *skimmer cone*. El *sampler cone* que se encuentra directamente expuesto al plasma, debe ser ubicado en la región de mayor eficiencia de ionización, reduciendo las reacciones que puedan aportar a la formación de iones moleculares o recombinaciones ion-electrón con la consecuente formación de especies neutras. El *skimmer cone* es utilizado para favorecer la separación del haz de iones provenientes del plasma de átomos de gas y moléculas neutras, que de llegar al analizador de masas podrían desviar los iones de las trayectorias ideales, perturbando su movimiento dentro del analizador (Prohaska 2015).

Los iones que han atravesado los conos de la interfaz son focalizados y guiados hacia el analizador de masas mediante un sistema de lentes de transferencia. Éstos tienen la función de extraer los iones del flujo de partículas que atraviesa los orificios de los conos, acelerarlos y dirigirlos hacia la rendija de entrada del analizador de masas, en este caso un sector magnético (Prohaska 2015).

A continuación, se describe cómo funciona el analizador de masas en base a la configuración del instrumento utilizado a los fines de esta tesis: ICP-SFMS Thermo Fisher Scientific modelo Element2 (Figura 2). Este equipo utiliza una configuración Nier-Johnson reversa, dado que la separación de los iones es realizada en una primera etapa en el analizador de sector magnético y luego en el analizador electroestático.

Cuando un ion con carga z , masa m y velocidad v entra en un campo magnético B perpendicular a su trayectoria, experimenta una fuerza magnética F_m perpendicular tanto a su trayectoria como al campo según la ecuación 1:

$$F_M = z * v * B \quad \text{Ec. 1}$$

Esta fuerza actúa como fuerza centrípeta, desviando el ion de su trayectoria recta y obligándolo a describir una trayectoria circular de radio (r).

La fuerza centrípeta necesaria para mantener este movimiento es:

$$F_c = \frac{m * v^2}{r} \quad \text{Ec. 2}$$

Igualando Ec.1 y Ec.2 obtenemos:

$$z * v * B = \frac{m * v^2}{r} \rightarrow r = \frac{m * v}{z * B} \quad \text{Ec. 3}$$

Iones con el mismo *momentum* ($p = m \cdot v$) y la misma carga, seguirán la misma trayectoria curva dentro del campo magnético. Por tanto, el campo magnético actúa como analizador de *momentum* para el haz iónico, permitiendo una separación según masa y energía (Sturup 2000).

La energía cinética E_c de un ion acelerado por un potencial eléctrico U es:

$$E_c = \frac{m * v^2}{2} = z * U \rightarrow v = \sqrt{\frac{2 * z * U}{m}} \quad \text{Ec. 4}$$

Sustituyendo la velocidad en la Ec.3 obtenemos que:

$$r = \frac{1}{B} * \sqrt{\frac{2 * m * U}{z}} \quad \text{Ec. 5}$$

El radio de curvatura depende de:

- Masa del ion (m): a mayor masa, mayor radio.
- Carga del ion (z): a mayor carga, menor radio.
- Voltaje de aceleración (U): a mayor voltaje, mayor radio.
- Campo magnético (B): a mayor B , menor radio.

En el plasma, iones de un mismo elemento, son extraídos por la fuente en un rango de energía cinética. Esta banda de energía cinética depende mayormente de la distribución de Boltzman, de la energía de las moléculas de las cuales derivan los iones y de la inhomogeneidad del campo en el plasma. Por lo tanto, dos iones de distinta masa pueden describir el mismo radio de curvatura al pasar por el campo magnético. Para compensar este efecto, se utiliza un analizador de sector electrostático (ESA). En el ESA, los iones con energía cinética diferente al valor seleccionado golpean las láminas inferior y superior, razón por la cual no llegan al detector (Rugi 2010).

La utilización de dos analizadores de masa se denomina doble enfoque. Si la dispersión energética del sector magnético y del analizador electrostático son de igual magnitud, pero de sentido opuesto, ambos enfocarán tanto los ángulos de los iones (primer enfoque) como sus energías (segundo o doble enfoque), siendo dispersivos únicamente con respecto a la masa de los iones cuando se combinan (Thermo Fisher Scientific 2009).

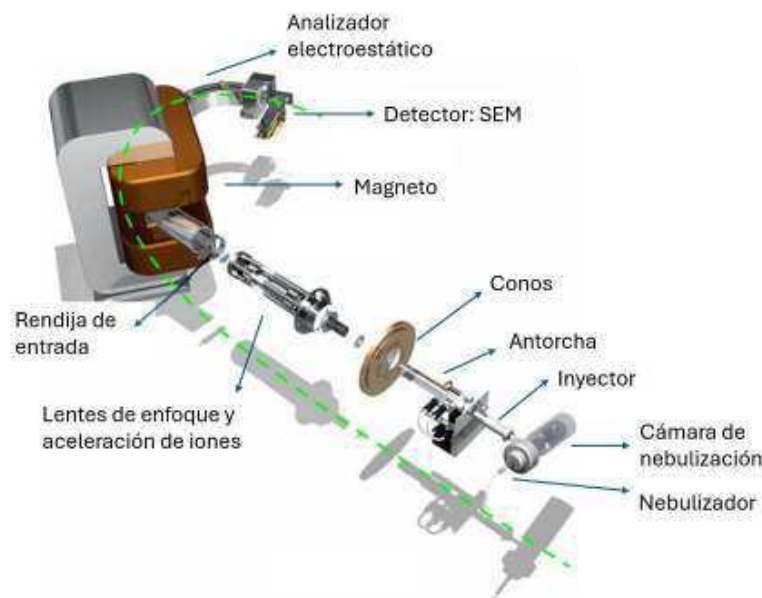


Figura 2 - Esquema ICP-SFMS Thermo Fisher Scientific modelo Element 2 Adaptado de (Thermo Fisher Scientific 2009)

Las interferencias espectrales en ICP-MS ocurren cuando iones atómicos o moleculares con la misma relación m/z que el isótopo del analito de interés alcanzan el detector. Estas interferencias pueden clasificarse en varios grupos, según su origen: iones atómicos isobáricos, iones moleculares y iones con carga múltiple (Thomas 2013).

La superposición isobárica ocurre cuando isótopos de diferentes elementos presentan la misma masa nominal. Para cada elemento, con la única excepción del indio, existe al menos un isótopo libre de este tipo de interferencia, aunque en muchos casos no corresponde al isótopo más abundante (Jakubowski, Moens y Vanhaecke 1998).

Los iones con doble o múltiple carga pueden generarse en cualquiera de los procesos de ionización que tienen lugar en el plasma y en la interfaz, dependiendo de las energías de ionización de los elementos. Este fenómeno ocurre especialmente como consecuencia de descargas secundarias en la región de la interfaz (Jakubowski, Moens y Vanhaecke 1998).

Las interferencias moleculares pueden originarse en la propia muestra analítica, como es el caso de los óxidos, que debido a su elevada energía de enlace tienen una probabilidad significativa de “sobrevivir” al paso por la zona caliente del plasma. También pueden derivarse de componentes presentes en el gas portador, el gas auxiliar o el gas de refrigeración, así como de impurezas en el sistema de introducción de la muestra. Estas especies moleculares pueden formarse en el plasma, en la interfaz e incluso en el propio espectrómetro de masas, como resultado de reacciones químicas o procesos de recombinación. Un ejemplo típico lo constituyen los óxidos y oxo-hidróxidos metálicos (por ejemplo, MO^+ , MOH^+), cuya formación se ve favorecida por la presencia de oxígeno o vapor de agua en el sistema (Jakubowski, Moens y Vanhaecke 1998).

Una de las ventajas más notables del ICP-SFMS es su capacidad de operar a diferentes resoluciones de masa, baja resolución $R = 300$ ($m/\Delta m$, valle al 10%), media resolución R

=4000 y alta resolución $R \sim 10000$, a diferencia de espectrómetros de masas cuadrupolares (ICP-QMS), que tienen resoluciones típicas de ~ 300 . El uso de un mayor poder de resolución permite resolver eficazmente interferencias espectrales, como las originadas por especies poliatómicas (ej. $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$) que afectan la detección de elementos como el As, Fe, Cr en instrumentos de baja resolución. Un ICP-SFMS puede resolver estas interferencias sin necesidad de sistemas de corrección matemática o uso de celdas de colisión/reacción, (Figura 3).

Molecular ion	Nuclide	Resolution
<i>R</i> < 3000		
$^{12}\text{C}_2^+$	$^{24}\text{Mg}^+$	1605
$^{14}\text{N}_2^+$	$^{28}\text{Si}^+$	958
$^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$	$^{28}\text{Si}^+$	1557
$^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{16}\text{H}^+$	$^{31}\text{P}^+$	968
$^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$	$^{31}\text{P}^+$	1458
$^{16}\text{O}_2^+$	$^{32}\text{S}^+$	1801
$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$	$^{44}\text{Ca}^+$	1281
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$	$^{51}\text{V}^+$	2572
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{16}\text{H}^+$	$^{52}\text{Cr}^+$	1671
$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	$^{52}\text{Cr}^+$	2375
$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$	$^{54}\text{Fe}^+$	2088
$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$	$^{56}\text{Fe}^+$	2502
$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$	$^{63}\text{Cu}^+$	2790
$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$	$^{64}\text{Zn}^+$	1952
<i>R</i> : 3000–7500		
$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$	$^{48}\text{Ti}^+$	2519
$^{32}\text{S}_2^+$	$^{64}\text{Zn}^+$	4261
<i>R</i> : 7500–10 000		
$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$	$^{75}\text{As}^+$	7775
$^{40}\text{Ar}_2^+$	$^{80}\text{Se}^+$	9688

Figura 3 - Resoluciones necesarias para resolver interferencias típicas en ICP-MS (Jakubowski, Moens e Vanhaecke 1998)

El ICP-SFMS ofrece, por lo general, una sensibilidad superior a la del ICP-QMS por dos motivos principales. En primer lugar, la transmisión iónica en los cuadrupolos puede depender de la masa, lo que ocasiona pérdidas en el extremo superior de la escala de masas, fenómeno que no se presenta en los espectrómetros de sector

magnético. En segundo lugar, los sistemas de lentes de los instrumentos de doble focalización no requieren un bloque central del haz (*photon stop*) para la reducción de ruido, evitando así pérdidas adicionales de señal. Además, la doble curvatura de la trayectoria de vuelo en un instrumento de campo sectorial, combinada con las rendijas de entrada y salida, permite reducir eficazmente el fondo no espectral hasta 0,1 cps, valor que puede ser hasta un orden de magnitud inferior al mejor registrado en instrumentos de cuadrupolo (Jakubowski, Moens y Vanhaecke 1998).

Estas ventajas en cuanto a sensibilidad y ruido permiten a un ICP-SFMS alcanzar límites de detección en el rango de sub-ppt (partes por trillón). Esta capacidad es clave para aplicaciones donde es necesario cuantificar elementos en concentraciones extremadamente bajas, como en el monitoreo de contaminantes en aguas ultrapuras, análisis de tierras raras, y control de calidad de materiales de alta pureza.

Las ventajas anteriormente mencionadas sumadas a la estabilidad del sistema permiten realizar mediciones precisas de relaciones isotópicas, fundamentales en estudios de procedencia geológica, arqueometría, control de calidad nuclear y metrología.

2.5 Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente

En la técnica ICP-AES, la luz emitida por los átomos y iones excitados en el plasma se mide para obtener información sobre la muestra. La luz es emitida a las diferentes longitudes de onda, asociadas a las transiciones electrónicas de desexcitación de átomos y iones presentes en el plasma. Como las especies excitadas en el plasma emiten luz en distintas longitudes de onda, la emisión resultante es policromática. Esta radiación policromática debe separarse en longitudes de onda individuales para que la emisión de cada especie excitada pueda identificarse y su intensidad medirse sin

interferencias procedentes de otras longitudes de onda (Rugi 2010) (Boss y Fredeen 2004).

La separación de la luz según su longitud de onda se realiza habitualmente mediante un monocromador, que mide la luz en una única longitud de onda por vez, o mediante un policromador, capaz de medir simultáneamente en varias longitudes de onda. Una vez separada la luz, su detección se efectúa con un detector fotosensible, como un tubo fotomultiplicador (PMT), o mediante técnicas avanzadas como el dispositivo de inyección de carga (CID) o el dispositivo acoplado por carga (CCD) (Boss y Fredeen 2004).

En los espectrómetros ICP-AES secuenciales (Figura 4), la medición de los elementos se realiza de manera individual, seleccionando una longitud de onda a la vez mediante un monocromador, por lo cual el análisis es más lento, ya que el instrumento debe reposicionarse mecánicamente para cada medición, y las variaciones en el plasma entre lecturas pueden afectar la precisión en análisis multielemento (Skoog, Holler e Crouch 2018).

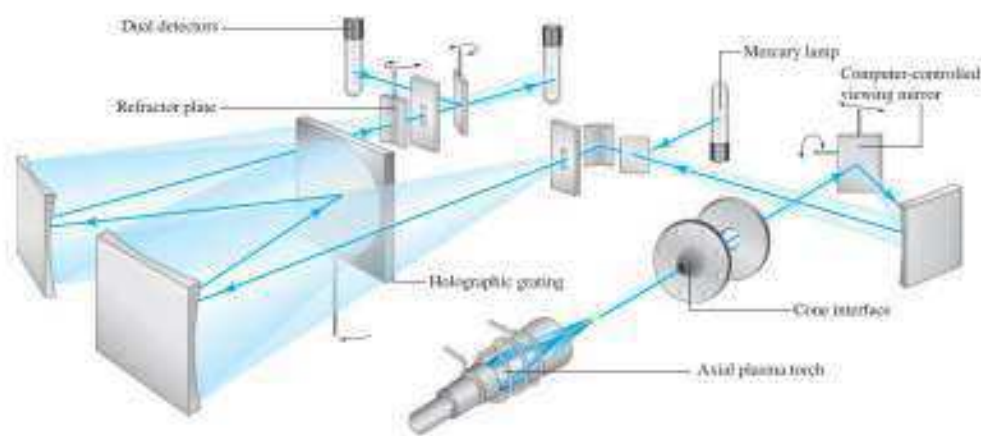


Figura 4 - Ejemplo de diseño óptico de un ICP-AES secuencial (Skoog, Holler e Crouch 2018)

La Figura 5 muestra la vista externa del ICP-AES secuencial utilizado en la presente tesis.

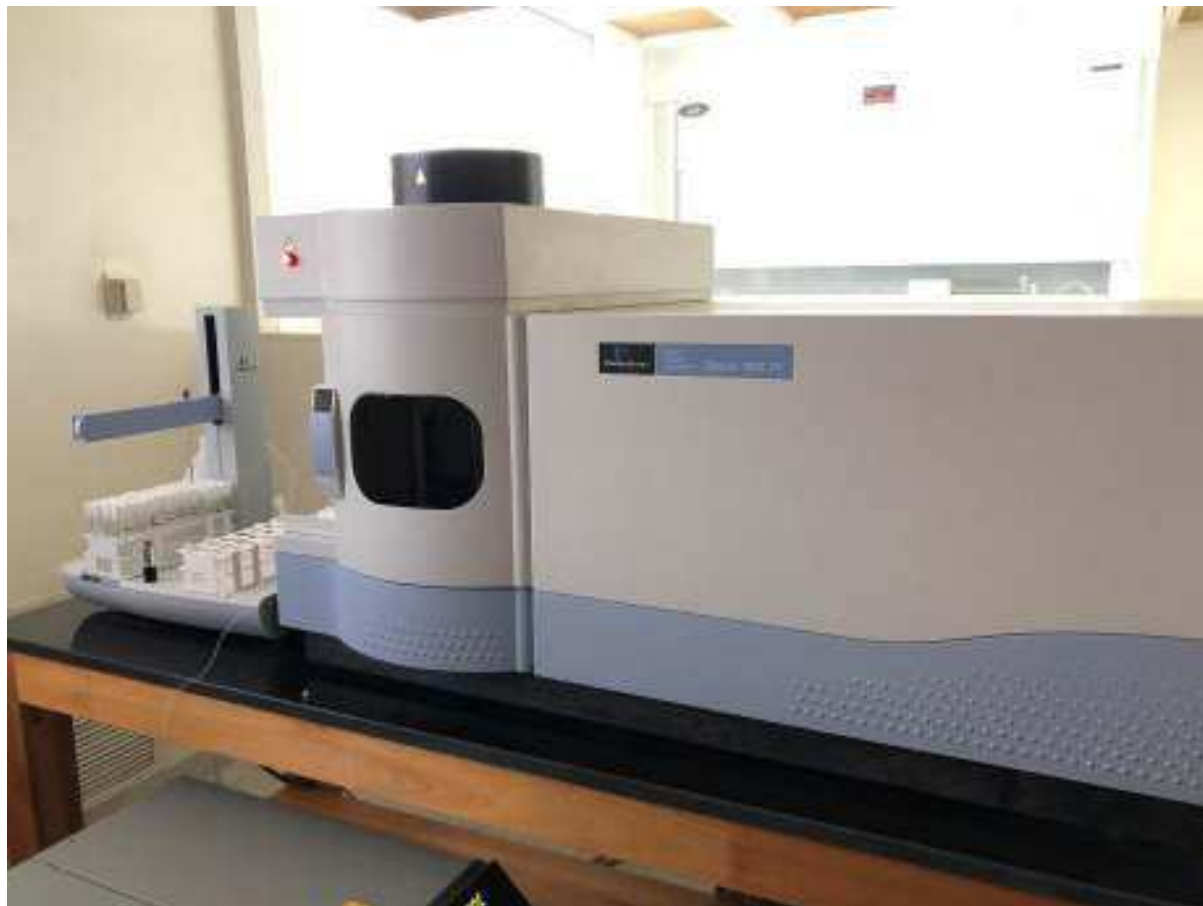


Figura 5 - ICP-AES PerkinElmer Optima 7000 DV. Departamento de Metrología Química, LATU.

Por el contrario, los espectrómetros ICP-AES simultáneos (Figura 6) emplean un policromador que dirige la luz a múltiples detectores, permitiendo registrar varias longitudes de onda de manera simultánea. Esta configuración ofrece gran rapidez, repetibilidad y mayor eficiencia cuando utilizamos estándar interno, dado que todos los elementos se miden bajo las mismas condiciones de plasma, lo que minimiza errores asociados a fluctuaciones temporales (Rugi 2010).

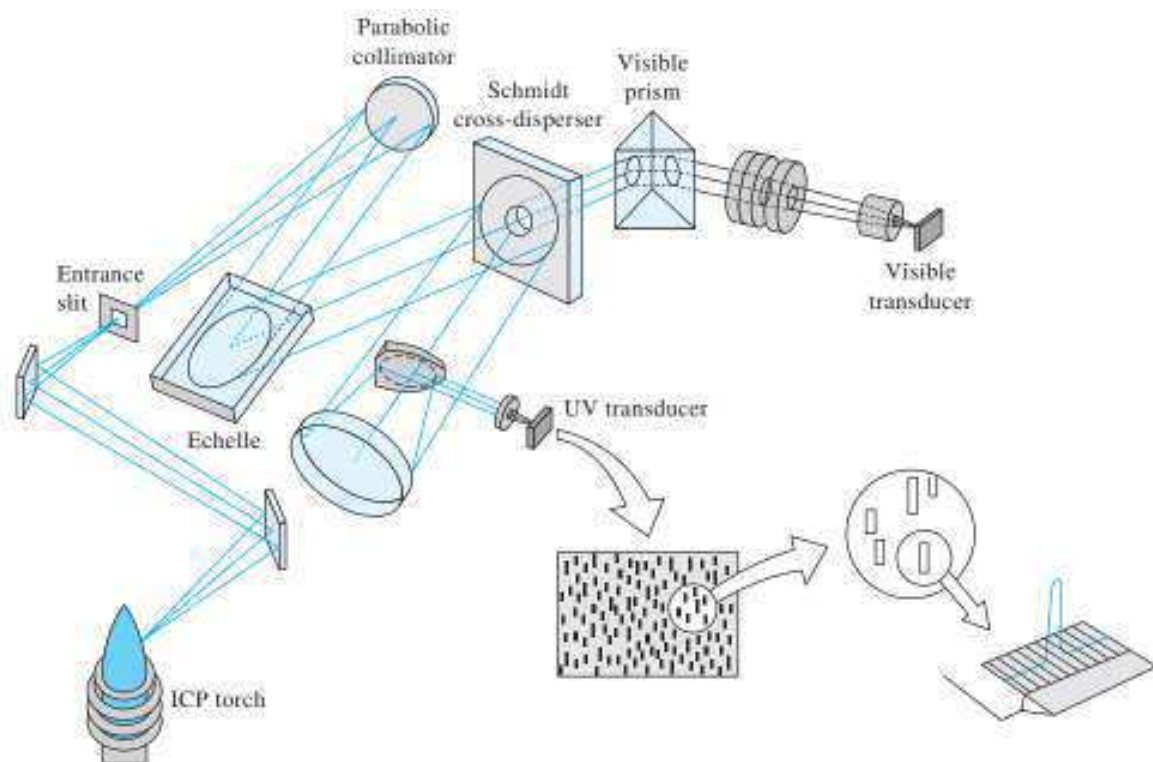


Figura 6 - Ejemplo de diseño óptico de un ICP-AES simultáneo (Skoog, Holler e Crouch 2018)

En el análisis mediante ICP-AES, las interferencias pueden clasificarse en tres categorías principales: espectrales, físicas y químicas. Las interferencias espectrales se producen cuando la radiación emitida por otros elementos o especies moleculares se superpone parcial o totalmente con la línea de emisión del analito, dificultando su identificación y cuantificación. Su origen puede estar en líneas atómicas cercanas, emisiones de iones, o en bandas moleculares formadas en el plasma. Por lo general la selección de líneas espectrales libres de solapamiento es sencilla y además los instrumentos cuentan con sistemas de corrección de fondo avanzados.

Las interferencias físicas, que son compartidas con aquellas de ICP-MS, están relacionadas con variaciones en las propiedades físicas entre la muestra y calibrante, como viscosidad, densidad o tensión superficial, que afectan la eficiencia de nebulización y transporte del aerosol al plasma. Estos cambios modifican la cantidad de analito introducida, alterando la señal de manera indirecta. Un ejemplo común se

observa cuando se comparan soluciones con diferente contenido de solventes orgánicos o sales disueltas, que pueden afectar la formación del aerosol y la estabilidad del plasma.

Por su parte, las interferencias químicas se originan en reacciones dentro del plasma o en la etapa de atomización y excitación, que alteran la cantidad de átomos excitados del analito. Esto puede deberse a la formación de compuestos estables de difícil disociación, como óxidos, haluros o carburos, que reducen la eficiencia de emisión.

2.6 Digestión de muestras asistida por microondas

La determinación de elementos por ICP-AES e ICP-MS, cuando se utilizan los sistemas de introducción de muestra más ampliamente difundidos, requieren que los analitos de la muestra se encuentren en solución. En este sentido, la digestión de muestras asistida por microondas es una técnica que ha revolucionado la preparación de muestras en química analítica, desde su desarrollo inicial en la década de 1970 y su posterior consolidación en los años 1990 (Smith y Arsenault 1996).

Esta técnica se basa en la utilización de radiación electromagnética en la región de las microondas, típicamente a una frecuencia de 2.45 GHz, que interactúa directamente con las moléculas polares y los reactivos presentes en la matriz para inducir un calentamiento rápido y homogéneo. El fundamento físico de esta interacción se explica por la rotación de dipolos y la migración iónica, donde las moléculas dipolares como el agua y los ácidos absorben la energía electromagnética, generando vibraciones moleculares y fricción interna, que se traduce en un aumento de temperatura en todo el volumen del medio, a diferencia de los métodos convencionales que calientan por conducción desde una fuente externa. Esta capacidad de calentamiento volumétrico evita la formación de gradientes térmicos importantes dentro del reactor, lo que resulta

en una mayor uniformidad térmica y una digestión más eficiente y reproducible de las muestras (de Oliveira 2003).

Los sistemas de digestión por microondas más utilizados son los de cavidad cerrada (Figura 7 y Figura 8), donde se utilizan recipientes individuales (vasos de reacción) que se colocan cerrados, dentro de un rotor, el cual se introduce en la cavidad del microondas. Estos vasos se fabrican comúnmente en PTFE, PFA o cuarzo, materiales altamente resistentes a ácidos oxidantes y a las altas temperaturas generadas durante la digestión (Wong, Gu e Ng 1997). Su capacidad varía entre 30 y 100 mL, con una masa de muestra recomendada de 0,1 a 0,5 g para matrices orgánicas y hasta 1–2 g para matrices inorgánicas más estables. Los equipos comúnmente permiten alcanzar presiones de hasta 60–100 bar y temperaturas superiores a 200 °C, garantizando una descomposición eficiente con bajo porcentaje de carbono residual.

El funcionamiento del microondas requiere un balance cuidadoso entre parámetros físicos como la potencia del microondas, la duración de la irradiación, la temperatura máxima alcanzada y la presión interna del reactor. La potencia del microondas debe ser suficiente para excitar las moléculas polares y generar calor, pero controlada para evitar ebullición violenta o explosiones dentro del vaso cerrado. La temperatura se regula a través de sensores integrados y sistemas de retroalimentación que ajustan automáticamente la potencia, mientras que la presión interna se monitorea para garantizar que no se excedan los límites de seguridad.

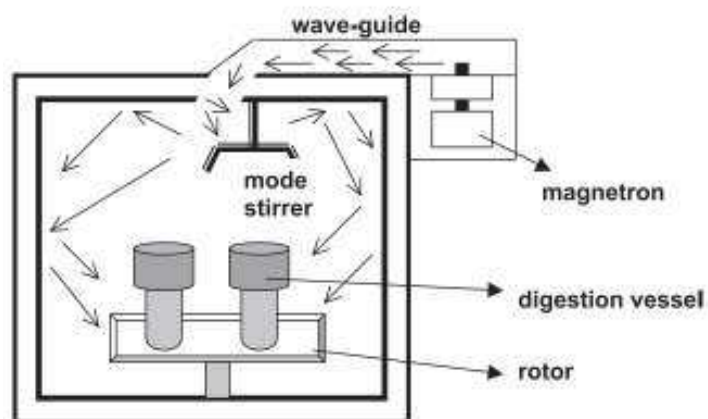


Figura 7 - Esquema de microondas de tipo cavidad (*de Oliveira 2003*)



Figura 8 - Microondas de cavidad utilizado en la tesis (*Anton Paar GmbH 2019*)

La selección de los reactivos depende de la naturaleza de la muestra, los analitos de interés y la compatibilidad química de los vasos de reacción. Principalmente se utilizan ácidos minerales concentrados de alta pureza, siendo el ácido nítrico (HNO_3) el más empleado por su fuerte poder oxidante y bajo nivel de contaminantes trazas. En combinación con HNO_3 , se utilizan frecuentemente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para matrices orgánicas resistentes, el ácido clorhídrico (HCl) para disolver haluros metálicos, y el ácido fluorhídrico (HF) en la digestión de silicatos y materiales geológicos (Mester y Sturgeon 2003).

Además de la ventaja en el control térmico, la digestión asistida por microondas permite reducir considerablemente los tiempos de digestión, en comparación con las técnicas tradicionales, como la digestión por vía húmeda en sistema abierto, donde pueden prolongarse por horas o incluso días. En las digestiones por microondas los tiempos se limitan a minutos en la mayoría de los casos, lo que aumenta la productividad y reduce el consumo energético.

Otro beneficio relevante es la disminución en el volumen y concentración de reactivos químicos necesarios para la digestión, favoreciendo así procedimientos más seguros y con menor impacto ambiental.

Los vasos de reacción cerrados empleados soportan elevadas presiones y temperaturas, que no serían posibles en sistemas abiertos, permitiendo la digestión completa incluso de matrices muy resistentes como tejidos biológicos, suelos y polímeros. Esta presión controlada, junto con sensores integrados de temperatura y presión, confiere alto nivel de control durante el proceso que contribuye a una digestión reproducible y a la protección del analito frente a pérdidas (de Oliveira 2003).

En la actualidad, la tendencia de la digestión asistida por microondas se orienta cada vez más hacia la sostenibilidad ambiental y la química verde, buscando minimizar el uso de reactivos peligrosos, reducir residuos y mejorar la eficiencia energética (Benedé y Pena-Pereira 2025).

CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipos

El secado de la muestra candidato a MRC fue realizado en una estufa Binder modelo FD115 (Tuttlingen, Alemania). La molienda fue realizada en un molino de cuchillas Retsch modelo GM200 (Hann, Alemania) y en un molino de rotor ultracentrífugo Retsch modelo ZM 200 (Hann, Alemania). El mezclado fue realizado en un agitador tipo pantalón Dilvan (Montevideo, Uruguay).

Las pesadas de muestra, MRC, MRC calibrantes, diluciones y adiciones fueron realizadas en balanza analítica Sartorius modelo MSE 225S-100-DA, capacidad máxima 220 g división 0,01 mg (Goettingen, Alemania), utilizando un ionizador Mettler Toledo (Greifensee, Suiza) para eliminar la estática o en una balanza Sartorius modelo MSE 524S-100-DI, capacidad máxima 520 g, división 0,1 mg (Goettingen, Alemania), la cual posee un ionizador incorporado.

Las condiciones ambientales durante el proceso de pesada fueron monitoreadas por un termohigrobarómetro TESTO modelo 622 (Kirchzarten, Alemania) o TESTO modelo 176P1 (Kirchzarten, Alemania).

Para la transferencia de líquidos se utilizaron pipetas automáticas en rango entre 0,1 y 10 mL Eppendorf y Thermo Fisher Scientific.

Como contenedores se utilizaron botellas Nalgene® de capacidad 30 y 125 mL fabricadas en LDPE (polietileno de baja densidad), que previo a su uso fueron descontaminadas con ácido nítrico 20% v/v durante 24 horas.

La muestra fue digerida en un microondas analítico Anton Paar modelo Multiwave PRO (Graz, Suiza) con rotor 8NXF100, con control de presión y temperatura en todos los vasos. La configuración del rotor 8NXF100 consiste en vasos de PTFE-TFM de 100

mL, los cuales son cubiertos por una camisa de cerámica. La presión máxima de trabajo fue de 60 bar y la temperatura máxima fue de 220 °C.

La evaporación del ácido remanente fue realizada en vasos de PTFE Cole-Parmer (USA) bajo campana de flujo laminar NuAire clase ISO 5 modelos NU-154 y NU-524 (Plymouth, USA)

La determinación de elementos fue realizada en un espectrómetro de emisión atómica secuencial con plasma acoplado inductivamente PerkinElmer modelo 7000DV (Shelton, USA) y en un espectrómetro de masas de sector magnético con plasma acoplado inductivamente Thermo Fisher Scientific modelo Element2 (Bremen, Alemania).

3.2 Reactivos y disoluciones

El agua utilizada en todos los casos fue agua purificada (resistividad a la salida de 18,2 MΩ.cm⁻¹) a través de un Sistema Millipore DirectQ3-UV (San Pablo, Brasil).

Para la digestión de las muestras se emplearon: ácido nítrico doblemente destilado a sub-ebullición en un destilador Milestone modelo DuoPur (Sorisole, Italia) a partir de ácido nítrico 69,5% m/m Carlo Erba (Val de Reuil Cedex, Francia), ácido fluorhídrico 40% m/m Merck Suprapur (Darmstadt, Alemania) y peróxido de Hidrógeno 30% m/m Merck Suprapur (Darmstadt, Alemania). Para aplicar el método de dilución isotópica se utilizó ¹¹¹Cd enriquecido al 97,23% (Isoflex, San Francisco, USA) y ²⁰⁶Pb enriquecido al 99,76% (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, USA). Soluciones de molibdeno Mo y estaño Sn, utilizadas para evaluar las interferencias en la determinación del Cd, así como la solución de germanio Ge utilizado como estándar interno en la determinación de arsénico As, fueron preparadas a partir de soluciones estándar 1000

mg/L (InorganicVentures, Christiansburg, USA). Una solución de cloruro de cesio 10 g/l fue preparada a partir de CsCl 99,9% m/m Ultrapure J.T. Baker (Alemania).

3.3 Materiales de Referencia Certificados

Como calibrantes fueron utilizados los siguientes MRC: NIST SRM 3103a Arsenic Standard Solution (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA), NIST SRM 3108 Cadmium Standard Solution., NIST SRM 3128 Lead Standard Solution, NIST SRM 981 Common Lead Isotopic Standard, NIST SRM 3139a Phosphorus Standard Solution y NIST SRM 3152a Sodium Standard Solution.

Como control de calidad fueron empleados los siguientes MRC: NIST SRM 1547 Peach leaves, NIST SRM 3254 Green Tea, NIST SRM 1570a Spinach Leaves y una muestra perteneciente a una comparación interlaboratorio CCQM-K89 herba ecliptae.

3.4 Selección del material de partida

Se monitorearon diversos lotes de producción, hasta encontrar uno con una fracción de masa de los elementos As, Cd y Pb en niveles cuantificables, idealmente cercanos a los límites establecidos por la normativa vigente. Se realizó una determinación preliminar de los elementos mediante calibración externa y detección por ICP-SFMS (As, Cd y Pb) e ICP-AES (Na, P). A partir de los resultados obtenidos, se verificó que los elementos se encontraban en la muestra en fracciones de masa cuantificables y acordes a los niveles esperados, con excepción del As, cuya fracción de masa ($\sim 0,05$ mg/kg), aunque cuantificable, es muy inferior respecto al máximo permitido por la normativa (0,6 mg/kg). Si bien el nivel de As es bajo, la posibilidad de dopar la muestra fue descartada, debido a la dificultad intrínseca que presenta la matriz y a la baja probabilidad de producir un lote homogéneo en este parámetro.

3.5 Determinación de humedad en el candidato a MRC

La determinación de humedad en el candidato a MRC fue realizada según método IRAM 20503:2019 (IRAM 2019) en estufa a 103 °C.

3.6 Determinación de la carga microbiológica en el candidato a MRC

La determinación de la carga microbiológica en el candidato a MRC fue realizada en el Departamento de Microbiología del LATU según APHA, 2015, 5th. Edition "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" capítulos 6, 7 y 21.

3.7 Procedimiento desarrollado para la determinación de cadmio y plomo por ID-ICP-SFMS

Se pesan exactamente en balanza analítica 0,5 g de muestra/MRC de control o 1 g de calibrante en un vaso de digestión. Se adiciona la cantidad necesaria de isótopo de ^{111}Cd y de ^{206}Pb en función de la masa y de la concentración de la muestra/calibrante/MRC de control para alcanzar una relación isotópica ($^{114}\text{Cd}/^{111}\text{Cd}$, $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$) igual a 1. Se añaden bajo campana de flujo laminar: 5 mL de HNO_3 doble sub-destilado, 4 mL de agua ultrapura, 2 mL de H_2O_2 30% m/m y 0,5 mL de HF 40% m/m. Se prepara un blanco de digestión por ronda de digestión el cual se lo somete a todo el proceso. Las muestras/calibrantes/MRC de control/blancos se digieren en un microondas analítico con control de temperatura y presión en todos los vasos. El programa de digestión es descrito en la Tabla 2.

Etapa	Potencia (W)	Tiempo (hh:mm)
Rampa de calentamiento	0 - 800	00:15
Mantenimiento	800	00:10
Rampa de calentamiento	800 - 1500	00:10
Mantenimiento	1500	00:30
Enfriamiento	0	*hasta alcanzar los 40 °C

Tabla 2 - Programa de digestión de muestras - Presión máxima 60 bar. Temperatura máxima: 220 °C.

A fin de eliminar el residuo de HF, luego de la digestión microondas, los digestos son trasvasados a vasos de teflón y evaporados hasta casi sequedad, en plancha a 200 °C bajo campana de flujo laminar Clase ISO 5, ver (Figura 9). El residuo (Figura 10) se disuelve con 1,5 mL de HNO₃ doble sub-distilado y agua ultrapura en plancha a 140 °C. La solución se deja enfriar y se trasvasa a una botella LDPE de 30 mL donde se completa el volumen con agua ultrapura.



Figura 9 – Digestos en proceso de evaporación

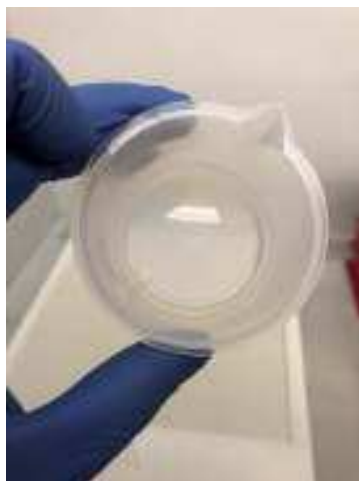


Figura 10 - Residuo luego de la evaporación

Se prepara una solución para determinar el factor de *mass discrimination* conteniendo Cd y Pb en una relación isotópica conocida. El Cd se prepara a partir del calibrante original y el Pb a partir del NIST SRM 981 "Common Lead Isotopic Standard". Se prepara una solución conteniendo Mo y una solución conteniendo Sn para evaluar el aporte de estas interferencias en las señales de Cd. Se realizan las mediciones en el ICP-SFMS en modo baja resolución. En la Tabla 3 se listan las condiciones operativas del ICP-SFMS.

Plasma	
Potencia Radiofrecuencia (W)	1250
Caudal gas plasma (L/min)	16
Caudal gas auxiliar (L/min)	0,86
Caudal gas nebulización (L/min)	≈ 1
<i>Guard electrode</i>	Si
Introducción de la muestra	
Cámara de nebulización	Cámara de cuarzo dual Ciclónica/Scott
Nebulizador	Meinhard PFA microflujo 100 mL/min
Inyector	Cuarzo 0,7 mm
Cono <i>sampler</i>	Níquel
Cono <i>skimmer</i>	Níquel
Adquisición de datos	
Isótopos monitoreados	⁹⁸ Mo, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd, ¹²⁰ Sn, ²⁰⁶ Pb, ²⁰⁸ Pb
Modo resolución	Baja R > 300
Modo de escaneo	E-scan
Ventana de masa (<i>mass window</i>)	100
Tiempo de muestreo (<i>sample time</i>) (ms)	0,015
<i>Samples per peek</i>	100
Ventana de búsqueda (<i>mass window</i>)	100
Ventana de integración (<i>integration window</i>)	80
<i>Run*passes</i>	6*3
Modo de detección	Ambos: <i>counting</i> y <i>analog</i>
Tipo de Integración	Promedio

Tabla 3 - Condiciones operativas para la determinación de Cd y Pb por ICP-SFMS

3.8 Procedimiento desarrollado para la determinación de arsénico por SA-ICP-SFMS

Se pesan en balanza analítica 1 g de muestra/MRC de control en un vaso de digestión. Se añaden bajo campana de flujo laminar: 8 mL de ácido nítrico doble sub-destilado, 4 mL de agua utrapura, 4 mL de H₂O₂ 30% m/m, 1 mL de HF 40% m/m y 0,2 mL de solución de estándar interno de Ge. La concentración de la solución de estándar interno de Ge se calcula en base a la concentración de arsénico en la muestra, de forma de medir cuentas en un rango similar. Se prepara un blanco de digestión por ronda de digestión el cual se lo somete a todo el proceso. Las muestras/MRC de control/blancos se digieren en un microondas analítico con control de temperatura y presión en todos los vasos.

A fin de eliminar el residuo de HF, luego de la digestión microondas, los digestos son trasvasados a vasos de teflón y evaporados hasta casi sequedad, en plancha a 200 °C bajo campana de flujo laminar Clase ISO 5. El residuo luego se disuelve con 1,5 mL de HNO₃ doble sub-destilado y agua utrapura en plancha a 140 °C. La solución se deja enfriar y se trasvasa a una botella LDPE de 30 mL donde se completa el volumen con agua utrapura (Fracción A).

En balanza se toma una alícuota del digesto de aproximadamente 15 g y se le añade gravimétricamente 0,2 g de solución estándar, a esta solución le llamamos fracción B. La fracción de masa de la solución estándar se calcula de modo que la fracción de masa en la solución aditivada sea aproximadamente tres veces la fracción de masa en el digesto. Se realizan las mediciones en el ICP-SFMS en modo alta resolución. En la Tabla 4 se listan las condiciones operativas del ICP-SFMS.

Plasma	
Potencia Radiofrecuencia (W)	1250
Caudal gas plasma (L/min)	16
Caudal gas auxiliar (L/min)	0,86
Caudal gas nebulización (L/min)	≈ 1
<i>Guard electrode</i>	Si
Introducción de la muestra	
Cámara de nebulización	Cámara de cuarzo dual Ciclónica/Scott
Nebulizador	Meinhard PFA microflujo 100 mL/min
Inyector	Cuarzo 0,7 mm
Cono <i>sampler</i>	Níquel
Cono <i>skimmer</i>	Níquel
Adquisición de datos	
Isótopos monitoreados	⁷² Ge, ⁷⁵ As
Modo resolución	Alta R ≈ 10000
Modo de escaneo	E-scan
Ventana de masa (<i>mass window</i>)	125
Tiempo de muestreo (<i>sample time</i>) (ms)	0,02 ms
<i>Samples per peek</i>	100
Ventana de búsqueda (<i>mass window</i>)	125%
Ventana de integración (<i>integration window</i>)	60%
<i>Run*passes</i>	6*6
Modo de detección	Ambos: <i>counting</i> y <i>analog</i>
Tipo de Integración	Promedio

Tabla 4 - Condiciones operativas para la determinación de As por ICP-SFMS

3.9 Procedimiento desarrollado para la determinación de fósforo y sodio por SA-ICP-AES

Se pesan en balanza analítica 0,5 g de muestra/MRC de control. Se añaden bajo campana de flujo laminar: 4 mL de HNO_3 doble sub-destilado, 4 mL de agua ultrapura, 2 mL de H_2O_2 30% m/m y 0,5 mL de HF 40% m/m. Se prepara un blanco de digestión por ronda de digestión el cual se lo somete a todo el proceso. Las muestras/MRC de control/blancos se digieren en un microondas analítico con control de temperatura y presión en todos los vasos.

A fin de eliminar el residuo de HF, luego de la digestión microondas, los digestos son trasvasados a vasos de teflón y evaporados hasta casi sequedad, en plancha a 200 °C bajo campana de flujo laminar Clase ISO 5. El residuo luego se disuelve con 1,5 mL de HNO_3 doble sub-destilado y agua ultrapura en plancha a 140 °C. La solución se deja enfriar y se trasvasa a una botella LDPE de 30 mL donde se completa el volumen con agua ultrapura. En balanza se toma una alícuota de digesto de 27 g y se añaden 3 g de una solución de CsCl 10 g/L como buffer de ionización para así formar la fracción A. Posteriormente se toman aproximadamente 15 g y se le añaden gravimétricamente 0,2 g de solución estándar conteniendo fósforo y sodio en las fracciones de masa adecuadas conformando la fracción B. La fracción de masa de la solución estándar se calcula de modo que la fracción de masa en la solución aditivada sea aproximadamente tres veces la fracción de masa de los analitos en el digesto. Se realizan las mediciones en el ICP-AES. En la Tabla 5 se listan las condiciones operativas del ICP-AES.

Plasma	
Potencia Radiofrecuencia (W)	1300
Caudal gas plasma (L/min)	15
Caudal gas auxiliar (L/min)	0,8
Caudal gas nebulización (L/min)	0,2
Introducción de la muestra	
Cámara de nebulización	Cámara de cuarzo ciclónica
Nebulizador	Meinhard
Inyector	Cuarzo 0,7 mm
Adquisición de datos	
Longitud de onda	Na: 589,592 nm, P: 213,624 nm
Procesamiento señal	Área de pico, 7 puntos por pico
Corrección señal de fondo	2 puntos

Tabla 5 - Condiciones operativas para la determinación de Na y P por ICP-AES

3.10 Validación analítica de los métodos

La validación se llevó a cabo con el objetivo de demostrar que los métodos desarrollados son adecuados para la determinación de los analitos objetivo en la matriz yerba mate, haciendo especial hincapié en la exactitud del método, para que el mismo sea adecuado para la certificación del candidato a MRC. La Guía Eurachem (Cantwell (ed) 2025) fue utilizada como base para establecer el plan de validación.

La selectividad del método viene dada por el poder de resolución de los espectrómetros, la correcta selección de las masas a monitorear para ICP-SFMS y de las longitudes de onda para ICP-AES y la capacidad de los métodos de cuantificación para minimizar el efecto de las interferencias multiplicativas. Para el caso de la determinación de Cd, se realizó un estudio profundo de las posibles interferencias espectrales, que no son capaces de ser resueltas a pesar de utilizar alta resolución.

Tanto el ICP-SFMS como el ICP-AES tienen como característica el tener un amplio rango lineal. El mismo verificado utilizando soluciones de MRC de los elementos en todo el rango esperado. Las diferentes curvas de calibración para cada elemento fueron construidas, se realizó una inspección visual y se calculó el coeficiente de determinación (R^2), que debía ser $\geq 0,999$.

La sensibilidad fue determinada a partir de las pendientes de la curva de calibración.

El límite de detección instrumental fue determinado como la concentración igual a 3 veces la señal de la solución blanco (HNO_3 5% v/v para ICP-SFMS, y CsCl 1 g/L para ICP-AES).

El límite de cuantificación del método fue estimado a partir del punto de menor concentración de la curva de calibración, afectado por los factores de dilución del método.

La precisión del método en condiciones de repetibilidad y la precisión intermedia fue determinada de acuerdo con el Anexo C de la guía Eurachem, realizando un mínimo de 7 réplicas en al menos un día y realizando las determinaciones en el caso de la yerba, en 3 días espaciados en el tiempo.

La veracidad de los métodos fue estimada en términos de recuperación, empleando Materiales de Referencia Certificados. En el caso del Na, para el cual no se pudo adquirir un MRC certificado en este parámetro, la veracidad fue estudiada a partir de los resultados del estudio interlaboratorio organizado con la muestra de yerba mate candidato a MRC.

La incertidumbre de los métodos fue estimada para As, P y Na aplicando la ley de propagación de la incertidumbre (JCGM 100 2008), mientras que para Cd y Pb utilizando el método Kragten (Johra 2024). Dado que el método de Kragten no forma parte de las metodologías oficiales del JCGM para estimación de incertidumbre, su

aplicación se validó empleando el método de simulación de Monte Carlo (JCGM 101 2008).

La selección entre la aplicación de la ley de propagación de la incertidumbre y el método de Kragten responde a criterios de practicidad: el método de Kragten permite simplificar los cálculos al no requerir la determinación de derivadas parciales, manteniendo una estimación adecuada de la incertidumbre.

Cabe destacar que estas metodologías que se conocen también como enfoque “bottom-up” si bien son más laboriosas y requiere más datos que las metodologías “top-down”, ofrecen un mapa detallado de todas las fuentes de incertidumbre y permite demostrar trazabilidad metrológica completa, reduciendo al mínimo las posibles suposiciones que se puedan realizar al modelo.

Por último, la exactitud del método fue evaluada a partir de los datos de veracidad e incertidumbre utilizando como parámetro de evaluación el error normalizado y a partir de los resultados del estudio interlaboratorio.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Preparación del candidato a Material de Referencia

4.1.2 Molienda

4.1.2.1 Elección del molino

Al ser la yerba una mezcla de hojas y tallos es de vital importancia realizar una correcta molienda, de forma de asegurar un polvo con un bajo tamaño de partícula, que mejore las perspectivas de obtener un lote homogéneo.

Las tecnologías presentes en el laboratorio eran: molino de cuchillas, molino de corte y molino de rotor ultracentrífugo. El molino de cuchillas Retsch Modelo GM200 puede alcanzar un tamaño de partícula $< 0,3$ mm, pero al no contar con una malla, el valor aportado por el fabricante es aproximado y dependerá fuertemente del tipo de producto introducido. El molino de corte Retsch Modelo SM200 tiene la posibilidad de alcanzar una granulometría final seleccionable mediante tamices de fondo de 0,25 mm. El molino de rotor ultracentrífugo Retsch ZM 200 (Figura 11) opera mediante mallas de diferentes aberturas (hasta 0,08 mm), las cuales definen el tamaño máximo de las partículas que atraviesan el sistema, generando un material molido caracterizado por una distribución granulométrica. Luego de analizar las opciones disponibles, teniendo principalmente en cuenta la baja granulometría, el molino ultracentrífugo fue la opción elegida, adquiriendo la malla de 0,08 mm.



Figura 11 - Molino ultracentrífugo Retsch ZM 200
Departamento de Metrología Química, LATU

4.1.2.2 Optimización de las condiciones de molienda.

La molienda de la muestra se realizó bajo campana de extracción a modo de minimizar la inhalación de material particulado por parte de los investigadores. Con la molienda de la muestra tal cual, con una velocidad de giro del rotor de 10000 rpm, se obtuvo una muestra con el tamaño de partícula deseado, pero se observó la formación de una “pasta” en la malla. La causa fue atribuida a la humedad presente en la muestra y al bajo tamaño de malla, que impide el pasaje de la muestra del rotor al plato colector. En estas condiciones, resulta impracticable utilizar el molino, para la cantidad de muestra necesaria. Se sometió entonces la muestra a un proceso de secado, el cual además de reducir el contenido de humedad, facilitando así la molienda, aportaría estabilidad frente a la degradación química/microbiológica.

Se realizó la determinación inicial de humedad en la muestra y el resultado obtenido fue 10% m/m. Posteriormente, la muestra fue introducida en contenedores de acero inoxidable, en una estufa con ventilación forzada durante 4 horas a 100 °C. Se repitió la determinación de humedad y el resultado fue 6,8% m/m.

Al bajar la humedad de la muestra, se evidenció aún más la necesidad de optimizar la velocidad de rotación del rotor y la descarga de la muestra en el molino, de modo de minimizar el tiempo de residencia. Cuando el tiempo de residencia es prolongado, la muestra se quema por las altas temperaturas alcanzadas, debido a la fricción entre la muestra, el rotor y la malla (Figura 12). Para mitigar el efecto del calentamiento, se prepararon mezclas de muestra con hielo seco en diferentes proporciones. Si bien el hielo seco resuelve el sobrecalentamiento, la proporción de volumen de hielo seco necesaria con respecto a la muestra fue de 1:1. Para el volumen de muestra que se contaba resultó impracticable en el laboratorio.

Se decidió entonces realizar una primera molienda en el molino de cuchillas y luego realizar la molienda final en el ultracentrífugo, para facilitar la molienda en este último y disminuir el tiempo de residencia de la muestra en el rotor. En el molino ultracentrífugo, se ensayaron revoluciones de 4000, 6000 y 10000 y distintos caudales de descarga. Se optó por trabajar a 6000 rpm y realizando una descarga de la muestra intermedia, aproximadamente 250 mL en 30 segundos. En este modo se obtuvo el mejor compromiso entre calidad final del producto y tiempo (Figura 13).



Figura 12 - Muestra quemada por sobrecalentamiento



Figura 13 - Muestra sin signos de degradación

4.1.3 Mezclado

El mezclado de la muestra se realizó en un agitador tipo pantalón (Figura 14). Como el volumen de muestra (7 litros aproximadamente) superaba la capacidad nominal del agitador (2 litros aproximadamente), se realizó un cuarteo, dividiéndola en 4 porciones. Cada porción se mezcló por 2 horas y se depositó en un contenedor de polipropileno. Una vez recolectadas las cuatro porciones se procedió a realizar una agitación manual, donde la muestra fue agitada por intervalos de 2 minutos, 20 veces. Se realizó un muestreo tomando 6 fracciones, las cuales fueron analizadas, determinándose las fracciones de masa de los elementos de interés por calibración externa (ICP-SFMS para As, Cd y Pb, ICP-AES para Na y P), de modo de tener una aproximación del grado de homogeneidad de la muestra. El porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) encontrado para los elementos As, Cd, Na y P fue menor a 5%. Por otro lado, el valor de RSD encontrado para el Pb fue de 8%. Por esta razón, se decidió repetir el procedimiento de agitación anteriormente mencionado. Una vez completado, se repitió la determinación de Pb y se verificó un descenso en el RSD a 4%, por lo cual se decidió continuar con el envasado.



Figura 14 - Mezclador tipo pantalón, LATU

4.1.4 Envasado

Para el envasado se decidió utilizar botellas de vidrio ámbar 60 mL para evitar daño de material por luz UV. El tamaño total del lote fue de 117 unidades.

4.1.5 Control de la carga microbiana

Un estudio microbiológico preliminar mostró cantidades indetectables (< 10 UFC/g) de microorganismos mesófilos aeróbicos, así como levaduras y hongos. Sin embargo, el material fue irradiado con rayos gamma a una dosis de 23 kGy, para asegurar la esterilización.

4.2 Optimización del tratamiento de muestra

4.2.1 Consideraciones preliminares

El tratamiento de muestra fue realizado a través de una digestión asistida por microondas. El programa recomendado por el fabricante para una muestra de origen vegetal indica el uso de ácido perclórico. Si bien es un ácido con características oxidantes y complejantes, por motivo de peligrosidad su uso es desaconsejado. La

mayoría de las digestiones reportadas en bibliografía para yerba mate utilizan HNO_3 o una mezcla de HNO_3 y H_2O_2 (Cordoba Bragança, Melnikov, & Zélia Zanoni, 2011; Alexandre Marcelo et al., 2014; Camotti Bastos et al., 2018; Flores et al., 2018; Pereira Schmite et al., 2019). Como se puede observar en la Figura 15, cuando no se utiliza un ácido complejante en la digestión de yerba, en el digesto quedan silicatos sin disolver que son visibles y confieren turbiedad. Los silicatos afectan la eficiencia en la nebulización de la muestra, llegando a obstruir el nebulizador. Por este motivo se decidió utilizar un ácido complejante, el HF.

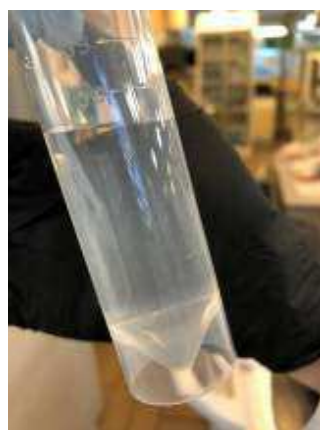


Figura 15 - Digestión de muestra sin HF

Entonces, en función de las características de la muestra se decide utilizar como reactivos: HNO_3 , HF, H_2O_2 y agua ultrapura.

De acuerdo con experiencia previa en matrices vegetales para una masa de 0,5 g de muestra se realizaron digestiones del material con los volúmenes de reactivos: 5 mL de HNO_3 , 4 mL de agua ultrapura, 2 mL de H_2O_2 y 0,5 mL de HF. Con estas proporciones se obtuvieron digestiones límpidas y por lo tanto se consideraron adecuadas al propósito.

4.2.2 Tratamiento de muestra para determinación de Arsénico

Los resultados de las determinaciones de arsénico preliminares sobre las muestras indicaron un contenido de aproximadamente 0,05 mg/kg. En estas condiciones, digiriendo una cantidad de muestra de 0,5 g estamos midiendo en el ICP-SFMS aproximadamente una concentración en masa de 0,8 µg/L de As. Si bien el instrumento es capaz de detectar una concentración en este nivel, el bajo número de cuentas afecta directamente la precisión, que terminará por influir en la incertidumbre final de medición. Como el objetivo de los métodos desarrollados es el de alcanzar una alta exactitud, razón por la cual la veracidad debe ser acompañada por una baja incertidumbre, se plantea como alternativa duplicar la masa de muestra a digerir de manera de aumentar la señal analítica (cuentas por segundo).

El incremento de la masa de muestra en una digestión asistida por microondas presenta desafíos significativos ligados al diseño de los sistemas cerrados. Al aumentar la cantidad de material, se intensifica la generación de gases, lo que eleva considerablemente la presión interna. Esto puede activar válvulas o sellos de seguridad, provocando pérdidas de analitos volátiles y comprometiendo la integridad del proceso de digestión.

Asimismo, la proporción entre masa de muestra y volumen de los reactivos es crítica para garantizar eficacia en la digestión. Un volumen inadecuado de ácido frente a una muestra mayor implica que no se asegura una digestión total, con la consecuente formación de residuos insolubles o muestras con una alta concentración de materia orgánica, con probable afectación de la exactitud del método.

El uso de diseño de experimentos como herramienta para optimizar el tratamiento de muestra para determinación de elementos ha sido frecuentemente reportado en bibliografía (Novaes, et al. 2016).

(Costa, et al. 2005) emplearon un diseño factorial completo de dos niveles 2^4 para optimizar la digestión ácida por microondas de muestras de aceite lubricante. Como variables independientes se evaluaron el tiempo de digestión, la potencia de radiación aplicada, la masa de muestra y el volumen de la mezcla ácida, mientras que como variables de respuesta se consideraron el contenido de carbono residual y la acidez final de las soluciones. Los resultados fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) y gráficos de Pareto.

(Sánchez Rojas, Bosch Ojeda, & Cano Pavón, 2010), realizaron un diseño factorial completo 3^3 para optimizar la digestión ácida asistida por microondas de cerámicas biomórficas de ZrO_2 . Se evaluaron como variables independientes el volumen de HNO_3 , el volumen de HF y el tiempo de digestión, mientras que la variable dependiente fue la concentración de elementos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y gráficos de Pareto para estudiar la interrelación de las variables.

(Cerqueira da Silva, et al. 2021) para optimizar la digestión ácida de muestras de bebidas con base de guaraná para la posterior determinación de elementos, aplicaron la estrategia de pseudo-componentes, evaluando la incidencia de los volúmenes de (H_2O_2 , HCl y HNO_3). Como variables de respuesta se emplearon los resultados de carbono residual y la respuesta instrumental de los elementos en estudio. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y gráficos de superficie.

El uso del carbono residual, como parámetro de evaluación de la eficiencia de digestión, también ha sido reportado en trabajos en donde se optimizan parámetros de digestión sin el uso de diseño de experimentos (Wasilewska, et al. 2002), (Mesko, et al. 2015).

La presencia de carbono en solución cuando se determinan elementos por ICP-MS produce un efecto de incremento de la señal para elementos como: Sb, Te, Au, Se, As, Hg, I y P. Este efecto es independiente de la configuración del ICP-MS, cuadrupolo o

sector magnético y es debido a cambios en la población de iones dentro del plasma por reacciones de transferencia de carga basadas en carbono. Se puede observar también un aumento de señal, una supresión de señal o la ausencia total de efecto de matriz para B, Os, Pt, Ir, Cd, Be, Zn y S, dependiendo de las condiciones de operación del plasma seleccionadas. (Grindlay, et al. 2013).

En la optimización del tratamiento de muestras de aceite de frutos secos mediante digestión asistida por microondas, los autores (Ni, et al. 2018) encontraron que, para soluciones de digestión de muestra en el rango de 963 a 4500 mg C /L, se obtuvieron valores de recuperación de adición de solución estándar de elementos en los digestos más altos para elementos traza como Cr, Mn, Fe, Ni, Cu y As (desde 112% hasta 242% en el caso de As). Sin embargo, cuando la concentración de carbono en la solución de muestra era entre 423 y 695 mg C /L, los valores de recuperación se estimaron en un rango de 95% a 106%.

(Lee, Park e Lee 2023) utilizaron un valor umbral de 500 mg C /L en la optimización de la digestión de muestras asistida por microondas de arroz, donde se optimizaron los parámetros: masa de muestra y el volumen de reactivos: HNO₃ y H₂O₂, en la digestión de muestras asistida por microondas para posterior determinación de elementos por ICP-MS, de modo de evitar interferencias poliatómicas basadas en carbono.

4.2.2.1 Diseño de experimentos

Dado que no se contaba con experiencia previa en digestión de una masa de muestra orgánica de 1 g, se procedió a realizar un diseño de experimentos, de forma de optimizar el volumen de los reactivos, evaluando la influencia del HNO₃ y del H₂O₂ y así evaluar la eficiencia de la digestión.

Para la realización de este diseño se decidió no evaluar y por tanto fijar las variables: volumen de HF en 1 mL, volumen de agua ultrapura a adicionar en 4 mL, el programa de digestión, la temperatura máxima a alcanzar en 220 °C y la presión máxima en 60 bar.

En consecuencia, las variables independientes fueron el volumen de HNO₃ y el volumen de H₂O₂. Se estableció como variable dependiente el porcentaje de carbono residual, que fue determinado por ICP-SFMS. A menor concentración de carbono residual en el digesto, más eficiente se considera la digestión. La acidez residual, que es otro parámetro que frecuentemente se utiliza para evaluar la eficiencia de la digestión, no se incluyó dado que el residuo de la digestión es evaporado a sequedad para eliminar el HF.

El diseño experimental seleccionado para cumplir con el objetivo del estudio fue el diseño central compuesto (Central Composite Design, CCD) (Massart, et al. 1997). El CCD permite modelar efectos lineales, cuadráticos y de interacción entre factores, proporcionando una estimación robusta de la curvatura del sistema. En este trabajo se evaluaron dos factores experimentales; por lo tanto, el diseño se estructuró combinando: un diseño factorial completo 2² (cuatro puntos factoriales), puntos axiales o “estrella” ubicados a una distancia $\alpha=1,414$ del centro para explorar regiones extremas del espacio experimental, y puntos centrales. En total, el diseño permitió estudiar cinco niveles por factor, con un número considerablemente menor de experimentos que un diseño factorial completo 2⁵, manteniendo al mismo tiempo la capacidad de modelar superficies cuadráticas con precisión. Se realizaron cuatro repeticiones en el punto central para estimar la variabilidad experimental y evaluar la reproducibilidad del método. La elección del CCD se fundamenta en su eficiencia estadística, su capacidad para ajustar modelos predictivos con buena resolución y su uso consolidado en el desarrollo y optimización de métodos analíticos. El diseño

central compuesto fue creado y analizado utilizando el software R, librería rsm (Lenth 2009).

4.2.2.2 Determinación de carbono residual por ICP-SFMS

La determinación de carbono residual en digestos de muestras por ICP-AES ha sido ampliamente aplicada (Krushevska, et al. 1992), (Gouveia, et al. 2001), (Costa, et al. 2005), (Mesko, et al. 2015), (Marques, et al. 2017), (Ni, et al. 2018), (Cerqueira da Silva, et al. 2021), (Lee, Park e Lee 2023).

Por otro lado, las publicaciones referentes a determinación de carbono residual por ICP-MS son menos frecuentes. (Bhandari e Amarasiriwardena 2000) realizaron la determinación de carbono residual en digestos de miel de maple por ICP-QMS, monitoreando $^{13}\text{C}^+$ para evaluar la eficiencia de la digestión. (Nardi, et al. 2009) en polvo de huevo monitoreando $^{12}\text{C}^+$ y (Riisom, et al. 2018) en muestra de digestos de células monitoreando tanto $^{12}\text{C}^+$ como $^{13}\text{C}^+$. (Amaral, et al. 2015) estudiaron la determinación de carbono residual en muestras de digestos y aminoácidos por ICP-MS/MS (triple cuadrupolo) en modo *single quadrupole* ($^{12}\text{C}^+$, $^{13}\text{C}^+$) y en modo *shift mode* ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^+$). No se encontraron publicaciones referentes a la determinación de carbono residual por ICP-SFMS.

Como calibrante (Bhandari e Amarasiriwardena 2000) utilizaron glicina, (Amaral, et al. 2015) ácido oxálico y (Riisom, et al. 2018) ácido cítrico. (Gouveia, et al. 2001) encontró igual comportamiento para glucosa, urea y l-cisteína en ICP-AES.

En base a esto y a la disponibilidad de encontrar un material de pureza suficiente se decide utilizar glucosa (Mallinckrodt Chemicals, St.Louis, MO, USA) para construir la curva de calibración. Adicionalmente se utilizó Ytrio como estándar interno. Se prepararon 4 calibrantes de las siguientes concentraciones en masa: 25, 50, 100 y 250 mg/L en una solución de HNO_3 doble subdestilado 5% v/v. Los digestos fueron

diluidos según la concentración de ácido final de modo de obtener una concentración de ácido del 5% v/v. Con el uso de estándar interno se procuró disminuir el efecto de la diferente viscosidad entre las muestras y la curva de calibración que podría influir en la veracidad de los resultados.

Tanto $^{12}\text{C}^+$ como $^{13}\text{C}^+$ podrían estar sujetos a la interferencia del Mg^{2+} cuando se realiza la determinación en baja resolución. Sin embargo, no se encontraron en las publicaciones previamente mencionadas ninguna referencia a esta posible interferencia. Operando en el ICP-SFMS en modo media resolución, la interferencia sea tanto en el caso de $^{12}\text{C}^+$ como de $^{13}\text{C}^+$ es resuelta.

Al realizar la medición se observa una fuerte señal del blanco (HNO_3 5% v/v). Pueden existir diferentes orígenes para esta contaminación, pese a haberse tomado los recaudos necesarios: argón 5.0 (99,999% m/m), HNO_3 5% v/v de alta pureza como solución de lavado y conos descontaminados. Además, se observó un aparente efecto memoria, luego de analizar las soluciones calibrantes. Frente a estas observaciones, se aumentó el tiempo de lavado entre mediciones; se verificó asimismo la estabilidad de la línea base y se evaluó la contribución de la señal del blanco sobre los valores obtenidos para las muestras. Los resultados mostraron que la señal del blanco, aunque detectable, fue significativamente menor que las señales de las muestras. Adicionalmente se comparó la concentración equivalente al fondo (BEC - *Background Equivalent Concentration*) determinado con el reportado en literatura. El BEC determinado sea para $^{12}\text{C}^+$ que para $^{13}\text{C}^+$ fue de 3,7 mg/L. Sensiblemente menor al reportado por (Amaral, et al. 2015) 6,1; 6,5; 7,4 y 7,4 mg/L, para ($^{12}\text{C}^+$, $^{13}\text{C}^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$ y $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^+$). El LOD determinado como 3 veces la desviación estándar de 10 mediciones consecutivas de soluciones en blanco, dividido por la pendiente de la curva de calibración fue de 0,20 mg/L para $^{12}\text{C}^+$ y 0,25 mg/L para $^{13}\text{C}^+$. Comparable a los límites de detección encontrados por (Amaral, et al. 2015) 0,42; 0,23; 0,17 y 0,53 mg/L para $^{12}\text{C}^+$, $^{13}\text{C}^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$ y $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^+$, respectivamente.

Se evidenció una respuesta instrumental lineal tanto para $^{12}\text{C}^+$ como para $^{13}\text{C}^+$, con un coeficiente de determinación $R^2 > 0,999$ en ambos casos.

Para evaluar la veracidad se realizaron dos adiciones de calibrante a muestras de digestos, una a nivel de 50 mg/L y una segunda a 100 mg/L con una recuperación de 98,7% y 99,2% para $^{12}\text{C}^+$ y de 99,5% y 97,9% para $^{13}\text{C}^+$.

Como se puede apreciar en la Figura 16, al graficar los resultados de carbono residual en las muestras, obtenidos procesando la señal del $^{12}\text{C}^+$ versus los obtenidos para el $^{13}\text{C}^+$, se obtiene una recta de pendiente cercana a 1 y ordenada cercana a 0, lo cual indica, a priori, concordancia entre los resultados.

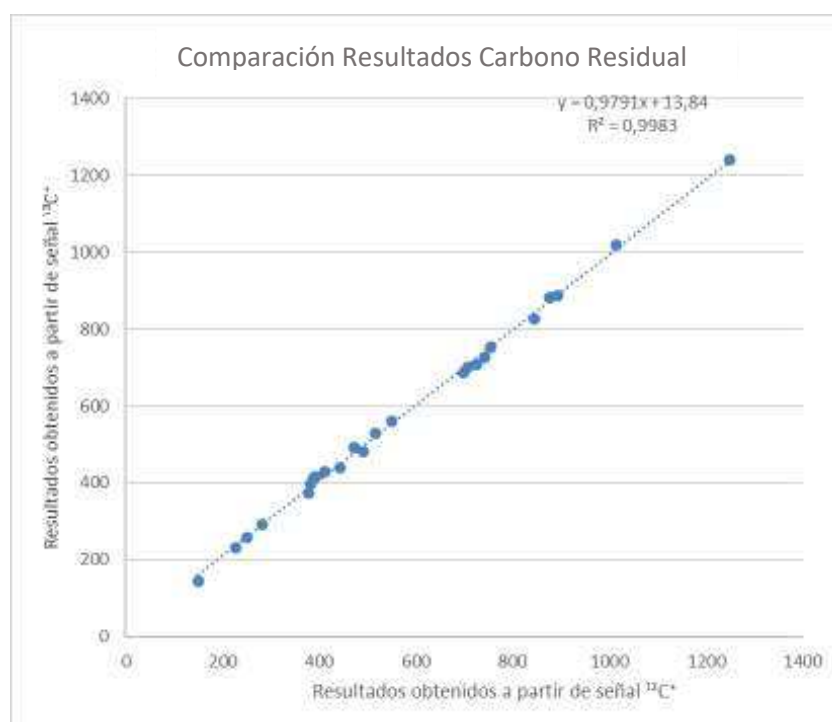


Figura 16 - Comparación resultados obtenidos procesando $^{12}\text{C}^+$ y $^{13}\text{C}^+$

Realizando un análisis de Bland-Altman (Giavarina 2015), determinando las diferencias entre los resultados (resultado $^{12}\text{C}^+$ - resultado $^{13}\text{C}^+$), podemos ver que la media de las diferencias (sesgo) es de -1,78. Esto indica que, en promedio, cuando se

cuantifica utilizando $^{13}\text{C}^+$ el resultado tiende a ser levemente superior. Pero este sesgo es muy pequeño comparado con el rango de valores (150 a 1248 mg/L).

El límite de acuerdo (LoA, 95 %) inferior es de -22,78 y el superior de +22,63. Esto significa que el 95 % de las diferencias entre los métodos caen en este intervalo (aprox. ± 25 mg/L). Ver Figura 17.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que la dispersión de las diferencias es baja y simétrica alrededor de cero. No hay indicios de sesgo proporcional, es decir, las diferencias no aumentan sistemáticamente con el tamaño de la medida. Ambos métodos muestran muy buena concordancia y las diferencias observadas son pequeñas en relación con el rango de las mediciones.

Por este motivo, para el procesamiento de datos posterior se tomarán en cuenta los resultados de carbono residual en base a la señal del $^{12}\text{C}^+$.

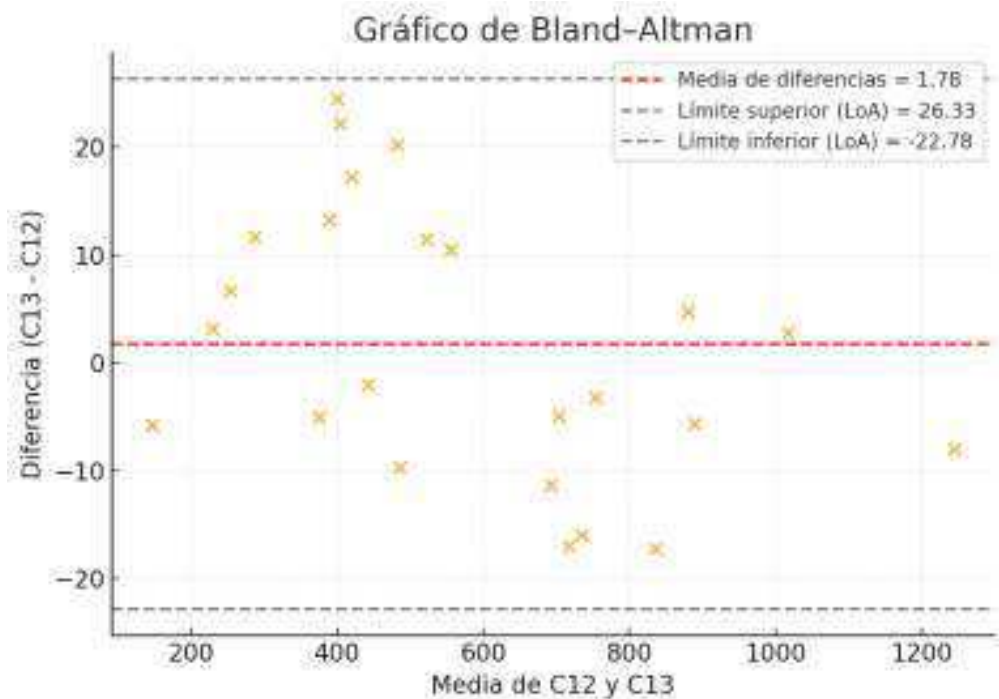


Figura 17 - Grafico de Bland-Altman para comparación de resultados de carbono residual cuantificando con $^{12}\text{C}^+$ y $^{13}\text{C}^+$

En la Tabla 6 se puede visualizar los volúmenes de ácido nítrico y de peróxido de hidrógeno ensayados, así como los resultados de carbono residual en los digestos.

N° experimento	V HNO ₃ (mL)	V H ₂ O ₂ (mL)	C residual (mg/L)
1	3,75	4	892
2	3,75	4	877
3	5	1,5	1015
4	5	1,5	1248
5	5	4	743
6	5	4	844
7	5	6,5	706
8	5	6,5	755
9	8	0,46	725
10	8	0,46	698
11	8	4	443
12	8	4	491
13	8	4	550
14	8	4	516
15	8	7,5	471
16	8	7,5	412
17	11	1,5	250
18	11	1,5	228
19	11	4	281
20	11	4	378
21	11	6,5	394
22	11	6,5	150
23	12,24	4	383
24	12,24	4	388

Tabla 6 - Diseño de experimentos y resultados carbono residual

En la Figura 18 se presentan los resultados del análisis de regresión para el diseño de experimentos.

```

call:
rsm(formula = Cresidual ~ SO(x1, x2), data = Reslg.cod)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-212.074  -60.680    5.714   52.685  194.837

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      499.25      45.92   10.872 2.43e-09 ***
FO(x1, x2)x1     -252.01      22.60  -11.149 1.63e-09 ***
FO(x1, x2)x2     -93.72      25.33   -3.700 0.00164 **
TWI(x1, x2)      108.51      35.75    3.035 0.00712 **
PQ(x1, x2)x1^2     64.14      33.27    1.928 0.06983 .
PQ(x1, x2)x2^2     35.68      30.92    1.154 0.26359
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 101.1 on 18 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.8936,    Adjusted R-squared:  0.8641
F-statistic: 30.25 on 5 and 18 DF, p-value: 3.696e-08

```

Figura 18 – Resultados del análisis de regresión del diseño de experimentos

En cuanto a la calidad del modelo para explicar la variabilidad de los datos, podemos decir que el modelo explica aproximadamente el 89,36% de la variabilidad en la variable dependiente. El R^2 ajustado es de 0,8641, lo cual sigue indicando un ajuste sólido. El valor del estadístico F es 30,25 ($p < 0,001$). Esto sugiere que, en conjunto, los predictores explican significativamente la variación en la variable dependiente. La media de los residuos es cercana a cero (5,714), lo cual muestra que no hay un sesgo significativo. Sin embargo, los valores extremos (mín y máx) sugieren la posibilidad de la presencia de algún valor atípico. El volumen de HNO_3 , como era de esperarse, tiene un impacto negativo significativo en la variable dependiente. Por cada unidad adicional (mL), la respuesta (concentración de carbono residual) disminuye en promedio 252 unidades. El volumen de H_2O_2 también tiene un impacto negativo (coeficiente = -93,72), sobre la concentración de carbono residual, pero menos

pronunciado que el volumen de HNO_3 . Llama la atención que la interacción entre las dos variables tenga un efecto positivo (coeficiente = 108,51). Esto puede deberse a que la presencia simultánea de altas concentraciones de ambos reactivos modera o atenúa el efecto negativo individual de cada uno, es decir no potencia el efecto, sino que produce un rendimiento marginal decreciente. El efecto cuadrático de la concentración de HNO_3 también tiene un impacto positivo, aunque marginalmente significativo ($p \approx 0,07$). El efecto cuadrático de la concentración de peróxido no es significativo ($p \approx 0,26$).

Si bien se podría continuar optimizando el método, para tener un mejor ajuste al modelo y quizás una mejor predicción, analizando el gráfico de contorno de la superficie de respuesta (Figura 19), podemos observar que utilizando 8 mL de HNO_3 y 4 mL de H_2O_2 obtenemos un valor de carbono residual en torno a 500 mg/L el cuál es adecuado (Lee, Park e Lee 2023). En torno a ese valor tenemos un *plateau*, para alcanzar una concentración más baja de carbono residual, por ejemplo 400 mg/L deberíamos utilizar varios mililitros más de HNO_3 , lo cual, si vemos el costo beneficio, ya sea económico o desde el punto de vista de la química verde no lo justifica.

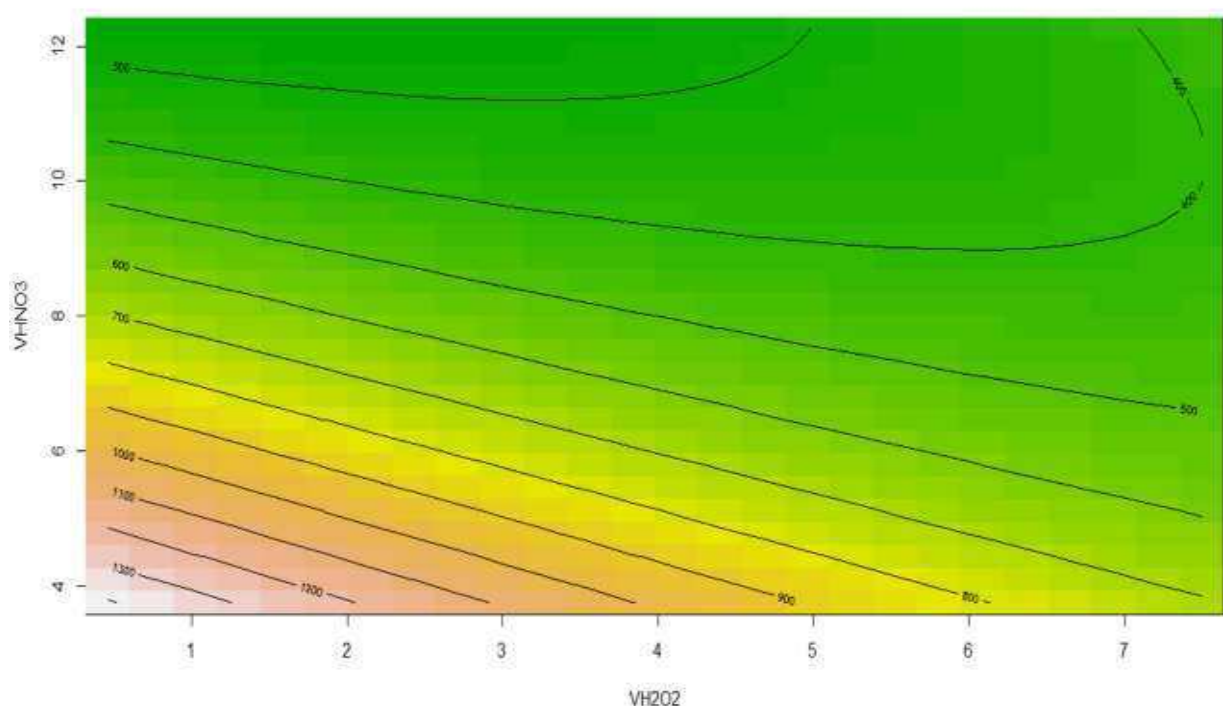


Figura 19 - Contorno de la superficie de respuesta: optimización de la digestión con masa de muestra 1 g

4.3 Desarrollo de la metodología para la determinación de cadmio y plomo por método dilución isotópica con detección por ICP-SFMS

Para que el procedimiento IDMS sea considerado método primario deben cumplirse ciertas condiciones: se complete el equilibrio isotópico entre el isótopo enriquecido y el analito; una correcta determinación de las masas atómicas y de las relaciones isotópicas medidas; el fraccionamiento isotópico inducido por el plasma o durante la introducción de la muestra debe ser monitoreado cuidadosamente para evitar errores sistemáticos y toda la cadena de medición debe ser sometida a una evaluación rigurosa de la incertidumbre (Vogl e Pritzkow 2010).

A estos desafíos se le suman los clásicos retos de las determinaciones por ICP-MS: la necesidad de una preparación de muestra rigurosa y libre de contaminación, la correcta selección de isótopos de forma de minimizar las interferencias espectrales, la

correcta reducción de interferencias espectrales sea isobáricas o poliatómicas y la estabilidad del sistema instrumental durante la adquisición de datos.

No obstante, a pesar de estas complejidades, la ID-ICP-MS sigue siendo uno de los métodos analíticos más sólidos disponibles en la actualidad para determinación de elementos, y su relevancia aumenta, a medida que crecen las exigencias regulatorias en torno a la exactitud de los resultados analíticos, la trazabilidad metrológica y la comparabilidad de resultados. El enfoque cuantitativo que ofrece, donde todas las variables son claramente identificadas y a las cuales se les asocia una incertidumbre, proporciona una herramienta de gran valor para la química analítica.

4.3.1 Selección de isótopos para cadmio

Para poder aplicar el método de dilución isotópica, se deben elegir dos isótopos: el isótopo de referencia y el isótopo *spike* (a adicionar).

El Cd es un elemento que tiene 8 isótopos: ^{106}Cd , ^{108}Cd , ^{110}Cd , ^{111}Cd , ^{112}Cd , ^{113}Cd , ^{114}Cd y ^{116}Cd . El isótopo de referencia debe ser seleccionado dentro de los más abundantes, ^{112}Cd (24,13%) y ^{114}Cd (28,73%). Las interferencias isobáricas y poliatómicas reportadas para estos isótopos son (May y Wiedmeyer 1998) (Machado, y otros 2017):

- ^{112}Cd : ^{112}Sn , $^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2$, $^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2$, $^{96}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$, $^{94}\text{Zr}^{18}\text{O}$, $^{96}\text{Zr}^{16}\text{O}$, $^{94}\text{Mo}^{18}\text{O}$, $^{95}\text{Mo}^{17}\text{O}$, $^{96}\text{Mo}^{16}\text{O}$.
- ^{114}Cd : ^{114}Sn , $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$, $^{98}\text{Ru}^{16}\text{O}$.

Como se puede ver en la Tabla 7, estas interferencias no son factibles de ser resueltas por el analizador de masas, dado que la resolución máxima del espectrómetro de masas de sector magnético es de $R \sim 10000$. En la Tabla 7 también se hace referencia a otras interferencias teóricas, como por ejemplo de las especies SeAr. Pero se debe tener

en cuenta que para que una especie sea interferencia, la misma debe tener una alta probabilidad de formación. La especificación del instrumento de trabajo para las interferencias poliatómicas es de una relación $BaO^+/Ba^+ < 0.002$, es decir por cada 1000 cuentas de Bario en la m/z 138, se registrarán 2 cuentas en la m/z 154. Cada especie poliatómica tiene, a su vez, una abundancia isotópica y una concentración en la muestra. Es teniendo en cuenta estos factores que elementos en baja concentración y/o con una abundancia isotópica baja no son interferentes.

	Abundancia (%)	Resolución		Abundancia (%)	Resolución
^{112}Cd	24,13		^{114}Cd	28,73	
$^{74}Ge\ ^{38}Ar$	0,02	5935	$^{76}Se\ ^{38}Ar$	0,01	5316
$^{72}Ge\ ^{40}Ar$	27,32	6113	$^{74}Ge\ ^{40}Ar$	36,93	5751
$^{76}Se\ ^{36}Ar$	0,03	6989	$^{78}Se\ ^{36}Ar$	0,08	6152
$^{76}Ge\ ^{36}Ar$	0,03	8101	$^{74}Se\ ^{40}Ar$	0,96	6156
$^{79}Br\ ^{33}S$	0,38	8629	$^{79}Br\ ^{35}Cl$	38,13	7042
$^{96}Mo\ ^{16}O$	16,52	35284	$^{81}Br\ ^{33}S$	0,37	7295
$^{96}Ru\ ^{16}O$	5,67	446895	$^{98}Ru\ ^{16}O$	2,21	36059
$^{96}Zr\ ^{16}O$	2,79	262930	$^{98}Mo\ ^{16}O$	23,94	37459
$^{95}Mo\ ^{17}O$	0,02	75337	^{114}Sn	0,65	196486
^{112}Sn	0,97	54281	$^{96}Mo\ ^{18}O$	0,03	240151
$^{94}Mo\ ^{18}O$	0,01	50691	$^{96}Ru\ ^{18}O$	0,01	33558
$^{94}Zr\ ^{18}O$	0,03	41193	$^{96}Zr\ ^{18}O$	0,01	27985

Tabla 7 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{112}Cd y ^{114}Cd , Adaptado (*Finnigan MAT 1995*)

Un análisis preliminar en la muestra descartó la presencia de rutenio y zirconio. Se detectó la presencia de estaño, el cuál fue trazado al blanco de digestión y al peróxido de hidrógeno puro para análisis, utilizado en la digestión de las muestras. Dado que podemos encontrar elementos, presentes como impurezas, en reactivos de calidad analítica convencional, especialmente en aquellos obtenidos por procesos que no

garantizan niveles de impurezas ultratrazas, se substituyó el peróxido de hidrógeno por un reactivo de pureza superior, adecuado para análisis a nivel trazas. Tras esta corrección, la señal de estaño no fue detectada, confirmando su origen como contaminación del reactivo y no como interferente presente en las muestras.

El isótopo ^{114}Cd es levemente más abundante que el ^{112}Cd y por tanto permite obtener mejor sensibilidad. Además, el isótopo de ^{114}Cd no está interferido por la especie poliatómica $^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2$, siendo el calcio un elemento que se encuentra en la muestra en alta proporción. Sin embargo, el isótopo de ^{114}Cd es más susceptible, según las abundancias teóricas, a la interferencia aportada por el óxido de molibdeno en sus diferentes variaciones isotópicas. En conclusión, se decide optar en primera instancia por el isótopo de ^{114}Cd , monitoreando la posible presencia de molibdeno, que podría interferir la m/z 114.

En el caso de la selección del isótopo *spike*, la elección no se basa solamente en las especies interferentes. La disponibilidad de encontrarlo en el mercado y la posibilidad de adquirirlo en forma metálica, para facilitar el proceso de disolución juegan un rol preponderante.

De los isótopos que pueden utilizarse como *spike*: ^{106}Cd , ^{108}Cd , ^{110}Cd , ^{111}Cd , ^{113}Cd y ^{116}Cd , el único isótopo que no presenta interferencias isóbaras es el ^{111}Cd , ver Tabla 8, Tabla 9 y Tabla 10. Si bien a los efectos de este trabajo las interferencias isóbaras tanto del estaño como del indio a priori no son relevantes, debido al costo de la inversión de comprar un isótopo, el isótopo que más versatilidad en futuras aplicaciones puede aportar se concluyó era el ^{111}Cd .

	Abundancia (%)	Resolución		Abundancia (%)	Resolución
¹⁰⁶Cd	1,25		¹⁰⁸Cd	0,89	
³⁸ Ar ⁶⁸ Zn	0,01	5608	³⁸ Ar ⁷⁰ Zn	18,72	6362
⁴⁰ Ar ⁶⁶ Zn	27,79	5869	⁹² Zr ¹⁶ O	17,07	25496
³⁶ Ar ⁷⁰ Ge	0,07	7223	⁹² Mo ¹⁶ O	15,01	43827
⁹⁰ Zr ¹⁶ O	51,34	15487	¹⁰⁸ Pd	26,46	369534
¹⁰⁶ Pd	27,33	35467			
⁸⁸ Sr ¹⁸ O	0,17	63151			
⁸⁹ Y ¹⁷ O	0,04	71849			

Tabla 8 – Interferencias isobáricas y poliatómicas ¹⁰⁶Cd y ¹⁰⁸Cd, Adaptado (Finnigan MAT 1995)

	Abundancia (%)	Resolución		Abundancia (%)	Resolución
¹¹⁰Cd	12,49		¹¹¹Cd	12,80	
⁷² Ge ³⁸ Ar	0,02	6039	⁷¹ Ga ⁴⁰ Ar	39,64	6485
⁷⁰ Ge ⁴⁰ Ar	20,44	6710	⁷⁵ As ³⁶ Ar	0,34	7372
⁷⁰ Zn ⁴⁰ Ar	0,60	7183	⁷⁹ Br ³² S	48,05	8051
⁷⁴ Ge ³⁶ Ar	0,12	7692	⁹⁵ Mo ¹⁶ O	14,74	32342
⁷⁴ Se ³⁶ Ar	0,00	8463	⁹⁵ Zr ¹⁶ O	0,01	87465
⁹⁴ Mo ¹⁶ O	9,33	36560	⁹³ Nb ¹⁸ O	0,20	81849
⁹⁴ Zr ¹⁶ O	17,36	61986			
⁹² Zr ¹⁸ O	0,03	92202			
Pd	11,72	50835			
⁹³ Nb ¹⁷ O	0,04	43927			
⁹² Mo ¹⁸ O	0,03	37118			

Tabla 9 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ¹¹⁰Cd y ¹¹¹Cd, Adaptado (Finnigan MAT 1995)

	Abundancia (%)	Resolución		Abundancia (%)	Resolución
^{113}Cd	12,22		^{116}Cd	7,49	
$^{75}\text{As } ^{38}\text{Ar}$	0,06	5624	$^{78}\text{Se } ^{38}\text{Ar}$	0,01	4687
$^{73}\text{Ge } ^{40}\text{Ar}$	7,73	6085	$^{76}\text{Se } ^{40}\text{Ar}$	9,08	5002
$^{79}\text{Br } ^{34}\text{S}$	2,13	6203	$^{76}\text{Ge } ^{40}\text{Ar}$	7,73	5527
$^{77}\text{Se } ^{36}\text{Ar}$	0,03	6661	$^{80}\text{Se } ^{36}\text{Ar}$	0,17	5600
$^{81}\text{Br } ^{32}\text{S}$	46,97	7038	$^{79}\text{Br } ^{37}\text{Cl}$	12,44	5648
$^{97}\text{Mo } ^{16}\text{O}$	9,58	32552	$^{81}\text{Br } ^{35}\text{Cl}$	37,27	5908
$^{96}\text{Mo } ^{17}\text{O}$	0,01	189659	$^{100}\text{Ru } ^{16}\text{O}$	12,67	20601
^{113}In	4,30	326974	^{116}Sn	14,53	38448
$^{95}\text{Mo } ^{18}\text{O}$	0,03	189533	$^{100}\text{Mo } ^{16}\text{O}$	9,66	48904
			$^{98}\text{Mo } ^{18}\text{O}$	0,05	597446

Tabla 10 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{113}Cd y ^{116}Cd , Adaptado (Finnigan MAT 1995)

4.3.2 Selección de isótopos para plomo

El Pb es un elemento que tiene 4 isótopos: ^{204}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb . Los isótopos de Pb no están fuertemente interferidos, excepto el isótopo ^{204}Pb que tiene al ^{204}Hg como interferencia isóbara (ver Tabla 11y Tabla 12).

El isótopo ^{208}Pb fue elegido como isótopo de referencia por ser el más abundante (52,40%). El isótopo ^{204}Pb es el que sería adecuado para a utilizar como *spike* debido a su baja abundancia (1,40%). Si bien no se detectó Hg en la muestra en estudio, el mismo se podría encontrar en otras muestras reduciendo el campo de aplicación del isótopo comprado. Los otros dos isótopos restantes ^{206}Pb y ^{207}Pb fueron considerados como posibles *spike*, optando por la compra del ^{206}Pb dado que era posible comprarlo con un nivel de enriquecimiento mayor al 99%.

	Abundancia (%)	Resolución		Abundancia (%)	Resolución
^{204}Pb	1,40		^{206}Pb	24,10	
$^{188}\text{Os}^{16}\text{O}$	13,17	9157	$^{190}\text{Os}^{16}\text{O}$	26,34	9768
$^{186}\text{W}^{18}\text{O}$	0,06	10459	$^{190}\text{Pt}^{16}\text{O}$	0,01	10506
^{204}Hg	6,85	459400	$^{188}\text{Os}^{18}\text{O}$	0,03	10591
			$^{189}\text{Os}^{17}\text{O}$	0,01	11997

Tabla 11 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{204}Pb y ^{206}Pb , Adaptado (Finnigan MAT 1995)

	Abundancia (%)	Resolución		Abundancia (%)	Resolución
^{207}Pb	22,10		^{208}Pb	52,40	
$^{191}\text{Ir}^{16}\text{O}$	38,41	10161	$^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}$	0,78	10057
$^{189}\text{Os}^{18}\text{O}$	0,03	11145	$^{192}\text{Os}^{16}\text{O}$	40,90	10275
$^{190}\text{Os}^{17}\text{O}$	0,01	11310	$^{190}\text{Os}^{18}\text{O}$	0,05	10930
			$^{191}\text{Ir}^{17}\text{O}$	0,01	12300

Tabla 12 - Interferencias isobáricas y poliatómicas ^{207}Pb y ^{208}Pb , Adaptado (Finnigan MAT 1995)

4.3.3 Corrección de interferencias

La corrección matemática de las interferencias se basa en la cuantificación de la especie interferente y la posterior sustracción a la señal de interés. Por ejemplo, si es de nuestro interés medir la señal ^{114}Cd , dado que la resolución del instrumento es limitada, no podemos resolver la interferencia isóbara que produce el isótopo ^{114}Sn en nuestra señal. Una de las formas de resolver este problema, es cuantificar cual es la contribución de la señal del ^{114}Sn en la señal analítica. Para ello se mide la intensidad de la señal del Sn en otra masa por ejemplo ^{120}Sn y se la relaciona con la intensidad que produce en la masa 114. Esta relación se establece utilizando un estándar de estaño, midiendo la señal que produce en la masa 114 y en la masa 120.

De igual manera procedemos con la interferencia poliatómica de los óxidos de molibdeno sobre la señal de ^{111}Cd y ^{114}Cd . Se cuantifica la influencia de la señal de los óxidos midiendo el isótopo de ^{98}Mo y estableciendo la relación entre la cantidad de

molibdeno en la muestra y la consecuente producción de óxido de molibdeno en el plasma.

Si bien la corrección matemática de interferencias es ampliamente difundida en ICP-MS (Thomas 2013), cabe destacar que cuando se aplica, se realizan determinados supuestos. En primer lugar, se asume que la relación entre la señal medida y las contribuciones interferentes es lineal y constante bajo las condiciones de análisis. En otras palabras, se presupone que la intensidad observada para un determinado isótopo es la suma de las señales provenientes del analito y de las especies interferentes, y que la proporción entre estas señales puede describirse mediante factores de corrección previamente determinados.

Otra suposición fundamental es que las interferencias son predecibles y reproducibles, es decir, que su contribución no varía de manera significativa con la matriz de la muestra ni con la concentración de otros elementos presentes. Esto implica asumir que los efectos de matriz, las variaciones en la eficiencia de ionización y las posibles reacciones secundarias dentro del plasma o el sistema de introducción de muestras son despreciables o controlables. Si estas condiciones no se cumplen, la corrección matemática puede introducir errores sistemáticos, ya que los modelos lineales empleados no reflejan con precisión la complejidad química real del sistema.

En la Tabla 13 se muestra el porcentaje que fue sustraído al número de cuentas inicial y las ecuaciones (Ec. 6 y Ec. 7) utilizadas para efectuar la corrección en las diversas muestras analizadas.

	¹¹¹ Cd	¹¹⁴ Cd
NIST SRM 1547 (Peach leaves)	0,41 %	0,92 %
NIST SRM 3254 (Green Tea)	1,5%	25%
Muestra CCQM-K89 (Herba Ecliptae)	0,24 %	0,53 %
Muestra yerba mate	0,70 %	1,32 %
$^{111}\text{Cd}_{\text{corregido}} (\text{cps}) = ^{111}\text{Cd}_{\text{muestra}} - [^{98}\text{Mo}_{\text{muestra}} * (^{111}\text{Cd}_{\text{std Mo}} / ^{98}\text{Mo}_{\text{std Mo}})] \text{ Ec. 6}$		
$^{114}\text{Cd}_{\text{corregido}} (\text{cps}) = ^{114}\text{Cd}_{\text{muestra}} - [^{98}\text{Mo}_{\text{muestra}} * (^{114}\text{Cd}_{\text{std Mo}} / ^{98}\text{Mo}_{\text{std Mo}})] - [^{120}\text{Sn}_{\text{muestra}} * (^{114}\text{Cd}_{\text{std Sn}} / ^{120}\text{Sn}_{\text{std Sn}})] \text{ Ec. 7}$		

Tabla 13 - Resultados de la corrección matemática de interferencias asociadas al oxido de molibdeno sobre las muestras y MRCs

Se puede observar que, en general, el porcentaje de corrección es relativamente pequeño (<2 %) excepto para la señal del ¹¹⁴Cd en NIST SRM 3254, donde la corrección significa un 25% del número de cuentas. Esto se debe a la presencia de estaño en el MRC, en una fracción de masa alta respecto a la fracción de masa de Cd.

La efectividad del método de corrección de interferencia se evalúa en conjunto con la veracidad del método a través del uso de materiales de referencia certificados de matriz.

4.3.4 Determinación de las relaciones isotópicas de plomo en las muestras

Como el Pb es un elemento cuya abundancia isotópica varía en la naturaleza de forma significativa (Zhu, et al. 2021), se debe realizar la determinación de la abundancia isotópica y el peso atómico en el MRC calibrante, en la muestra y en los MRC de control para poder cuantificarlo posteriormente.

En esta determinación, es particularmente crucial el rol que juega la correcta evaluación del *mass bias*. El *mass bias* refiere a la desviación del valor medido de las

relaciones isotópicas por el espectrómetro de masas respecto al “valor verdadero”. Esto se produce porque los iones generados en el plasma son transmitidos en el espectrómetro de masas con distinta eficiencia, principalmente debido a efectos espacio/carga, resultando en una respuesta no uniforme de la sensibilidad a lo largo del rango de masas y produciendo al final una inexactitud en la determinación de la relación isotópica (Yang e Strugeon 2003).

Para corregir el *mass bias*, la medición se realizó utilizando el MRC NIST 982 Common Lead Isotopic Standard y determinando el factor de corrección por *mass bias* como:

$$K = \frac{R_{teórico}}{R_{observado}} \text{ Ec. 8}$$

Como el MRC NIST 982 está certificado en relaciones isotópicas en función del ^{206}Pb , las relaciones isotópicas para calcular las abundancias también se determinan en función de este isótopo.

A partir de la medición de las relaciones isotópicas $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$, $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ y $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ se calculan las abundancias de acuerdo con las ecuaciones desarrolladas en la Figura 20.

La incertidumbre fue estimada según el método de Monte Carlo (JCGM 101 2008) utilizando la NIST Uncertainty Machine (Lafarge e Possolo 2015) disponible en <https://uncertainty.nist.gov/>. Los resultados se presentan en la Tabla 14.

$$Abundancia Pb204 = \frac{K_{204/206} * R_{204/206}}{1 + K_{204/206} * R_{204/206} + K_{207/206} * R_{207/206} + K_{208/206} * R_{208/206}}$$

$$Abundancia Pb206 = \frac{1}{1 + K_{204/206} * R_{204/206} + K_{207/206} * R_{207/206} + K_{208/206} * R_{208/206}}$$

$$Abundancia Pb207 = \frac{K_{207/206} * R_{207/206}}{1 + K_{204/206} * R_{204/206} + K_{207/206} * R_{207/206} + K_{208/206} * R_{208/206}}$$

$$Abundancia Pb208 = \frac{K_{208/206} * R_{208/206}}{1 + K_{204/206} * R_{204/206} + K_{207/206} * R_{207/206} + K_{208/206} * R_{208/206}}$$

Figura 20 - Ecuaciones de cálculo de las abundancias isotópicas del Pb

	NIST SRM 3128 Lead Standard	Muestra yerba mate	NIST SRM 1547 Peach Leaves	Muestra CCQM- K89 herba Ecliptae
²⁰⁴ Pb	0,013705 ± 0,000032	0,014003 ± 0,000086	0,01374 ± 0,00010	0,013812 ± 0,000072
²⁰⁶ Pb	0,24933 ± 0,00036	0,25136 ± 0,00070	0,25557 ± 0,00064	0,24883 ± 0,00046
²⁰⁷ Pb	0,21351 ± 0,00032	0,21250 ± 0,00068	0,21014 ± 0,00072	0,21396 ± 0,00054
²⁰⁸ Pb	0,52346 ± 0,00068	0,5221 ± 0,0013	0,5206 ± 0,0012	0,52339 ± 0,00086
PA (g/mol)	207,21 ± 0,17	207,20 ± 0,33	207,20 ± 0,32	207,21 ± 0,32

Tabla 14 – Resultado abundancias y pesos atómicos en las muestras y MRCs

4.3.5 Ecuación de cálculo método de dilución isotópica en dos etapas

La ecuación 9 fue utilizada para determinar la concentración de Pb por dilución isotópica. Como el Cd es un elemento cuya abundancia isotópica no varía en la naturaleza, se utiliza una versión levemente simplificada dado que $MA_x = MA_z$, $A_x = A_z$ y $B_x = B_z$.

$$W_x = W_z * \frac{m_{xy} * m_z}{m_x * m_{zy}} * \frac{MA_x}{MA_z} * \left(\frac{A_y - B_y * K * R_{xy}}{B_x * K * R_{xy} - A_x} \right) * \left(\frac{B_z * K * R_{zy} - A_z}{A_y - B_y * K * R_{zy}} \right) \quad \text{Ec.9}$$

- X: muestra
- Y: solución que contiene el isótopo enriquecido
- Z: calibrante
- X+Y: mezcla de la muestra con el isótopo enriquecido
- Z+Y: mezcla del calibrante con el isótopo enriquecido
- A: isótopo de referencia
- B: isótopo spike
- Relación isotópica (R): es la proporción isotópica entre dos isótopos de un mismo elemento. R se calcula considerando en el numerador al isótopo enriquecido y en el denominador al isótopo de referencia.
- MA_x : masa atómica del elemento en la muestra.
- MA_z : masa atómica del elemento en el calibrante.
- A_x : abundancia isotópica del isótopo de referencia en la muestra.
- A_y : abundancia isotópica del isótopo de referencia en la solución de isótopo spike.
- A_z : abundancia isotópica del isótopo de referencia en el calibrante.
- B_x : abundancia isotópica del isótopo spike en la muestra.
- B_y : abundancia isotópica del isótopo spike en la solución spike.
- B_z : abundancia isotópica del isótopo spike en el calibrante.
- w_x es la fracción de masa del analito en la muestra
- w_z es la fracción de masa del analito en el calibrante
- m_x es la masa de muestra en la mezcla (X + Y)
- m_{yx} es la masa de solución de isótopo enriquecido en la mezcla (X + Y)
- m_z es la masa de calibrante en la mezcla (Z + Y)
- m_{yz} es la masa de solución de isótopo enriquecido en la mezcla (Z + Y)
- K: factor de corrección por mass bias

4.3.6 Evaluación de la incertidumbre

La incertidumbre fue estimada utilizando el método Kragten.

4.3.6.1 Cadmio

En la Figura 21 se presentan las variables, el valor típico, la incertidumbre estándar de las variables y el cálculo para la determinación de Cd en la muestra candidato a MRC.

		mx	myx	mz	myz	wz	Axz	Bxz	Ay	By	K	Rxy	Rzy	Rep
	Valor típico	0,5232	1,0592	1,01066	1,08354	0,39603	28,75400	12,79500	0,01000	97,23000	0,84269	1,1478	1,19191	0,00000
	u	0,00034	0,00034	0,00034	0,00034	0,000584	0,0405	0,0060	0,2887	0,2887	0,0049	0,0112	0,00262	0,0011
	unidad	g	g	g	g	g	-	-	-	-	-	-	-	mg/kg
mx	0,52325	0,52359	0,52325	0,52325	0,52325	0,52325	0,52325	0,52325	0,52325	0,52325	0,52325	0,52325	0,52325	0,52325
myx	1,059210744	1,059210744	1,059550344	1,059210744	1,059210744	1,059210744	1,059210744	1,059210744	1,059210744	1,059210744	1,059210744	1,059210744	1,059210744	1,059210744
mz	1,01066	1,01066	1,01066	1,01100	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066
myz	1,08354	1,08354	1,08354	1,08354	1,08388	1,08354	1,08354	1,08354	1,08354	1,08354	1,08354	1,08354	1,08354	1,08354
wz	0,39603	0,39603	0,39603	0,39603	0,39603	0,39661	0,39603	0,39603	0,39603	0,39603	0,39603	0,39603	0,39603	0,39603
Ax	28,7540	28,7540	28,7540	28,7540	28,7540	28,7540	28,7945	28,7540	28,7540	28,7540	28,7540	28,7540	28,7540	28,7540
Bx	12,7950	12,7950	12,7950	12,7950	12,7950	12,7950	12,7950	12,801	12,7950	12,7950	12,7950	12,7950	12,7950	12,7950
Ay	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,298675135	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
By	97,2300	97,2300	97,2300	97,2300	97,2300	97,2300	97,2300	97,2300	97,2300	97,51867513	97,2300	97,2300	97,2300	97,2300
K	0,84269	0,84269	0,84269	0,84269	0,84269	0,84269	0,84269	0,84269	0,84269	0,84269	0,84762091	0,84269	0,84269	0,84269
Rxy	1,147792517	1,147792517	1,147792517	1,147792517	1,147792517	1,147792517	1,147792517	1,147792517	1,147792517	1,147792517	1,147792517	1,158994972	1,147792517	1,147792517
Rzy	1,19191	1,19191	1,19191	1,19191	1,19191	1,19191	1,19191	1,19191	1,19191	1,19191	1,19191	1,19191	1,194524011	1,19191
Rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001051869
w (x)	0,699168306	0,698714824	0,69939247	0,699403239	0,698949242	0,700199994	0,699219892	0,699151082	0,699088618	0,699168314	0,698952543	0,7112382	0,696400355	0,700220175
Σu(xi)		0,000453481	-0,000224165	-0,000234933	0,000219063	-0,001031689	-5,15865E-05	1,72233E-05	7,96877E-05	-8,14737E-09	0,000215763	-0,012069894	0,00276795	-0,001051869
Σu(xi)2	0,00015593	2,05645E-07	5,02498E-08	5,51936E-08	4,79888E-08	1,06438E-06	2,66117E-09	2,96642E-10	6,35013E-09	6,63797E-17	4,65537E-08	0,000145682	7,66155E-06	1,10643E-06
Mean value	0,699168306													
u	0,012487179													
U (k = 2)	0,024974359													
Rel	3,57%													

Figura 21 - Estimación de la incertidumbre de la fracción de masa de Cd en candidato A MRC por método Kragten

La estimación de la incertidumbre obtenida por Kragten fue validada estimando la incertidumbre por el método de Monte Carlo a través de la NIST Uncertainty Machine. Los resultados se presentan en la Figura 22.

```

----- RESULTS -----
Monte Carlo Method

Summary statistics for sample of size 1000000

ave      = 0.6993
sd       = 0.0124
median   = 0.6992
mad      = 0.012

Coverage intervals

99% ( 0.6678, 0.7317)    k = 2.6
95% ( 0.6752, 0.7238)    k = 2
90% ( 0.6791, 0.7199)    k = 1.6
68% ( 0.6869, 0.7117)    k = 1

ANOVA (% Contributions)

w/out Residual w/ Residual
mx             0.13      0.13
myx            0.04      0.04
mz             0.04      0.04
myz            0.03      0.03
wz             0.68      0.68
Axx            0.00      0.00
Bxx            0.00      0.00
Ay             0.00      0.00
By             0.00      0.00
K              0.04      0.04
Rxy            93.22     93.21
Rzy            5.03      5.03
Rep            0.79      0.79
Residual       NA       0.01

```

Figura 22 -Resultados estimación de la incertidumbre por método de Monte Carlo para la determinación de Cd en la muestra candidato a MRC

Como podemos observar el valor de incertidumbre estándar obtenida por el método Kragten es de 0,0125 mg/kg y por el método de Monte Carlo de 0,0124 mg/kg, por lo cual se concluye que con el método Kragten se obtiene una estimación de la incertidumbre adecuada.

La incertidumbre expandida relativa resultante es de 3,7%. Los resultados a su vez nos demuestran que la mayor contribución a la incertidumbre viene dada por la relación isotópica de la muestra (93,33%). Esto se debe a que, al aplicar factores de corrección matemática para minimizar el efecto de la interferencia del molibdeno, la incertidumbre de este factor se ve incrementada, más allá de lo que sería teniendo en cuenta únicamente la repetibilidad instrumental en la determinación de la relación isotópica.

4.3.6.2 Plomo

En la Figura 23 se presentan las variables, el valor típico, la incertidumbre estándar de las variables y el cálculo para la estimación de la incertidumbre en la determinación de Pb en la muestra candidato a MRC. La incertidumbre expandida relativa resultante es de 7,8%. En este caso la componente más significativa es la precisión del método. Cabe destacar que para la estimación se utilizó la precisión intermedia y no la repetibilidad de manera de obtener una estimación de la incertidumbre más representativa, que contemplara la variabilidad entre días.

		mx	myx	mz	myz	wz	MAx	MAz	Ax	Bx	Ay	By	Az	Bz	K	Rxy	Rzy	Rep
	Valor típico	0,523249	1,017467	1,01066	1,047899	0,211423	207,2047	207,2089	52,21376	25,13635	0,03	99,76	52,34029	24,93561	0,980162	0,989144	0,998991	0
	u	0,00034	0,00034	0,00034	0,00034	0,000204	0,167	0,05	0,064	0,0348	1,73E-05	0,057596	0,00488	0,000175	0,001508	0,003377	0,002095	0,015
	Type	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A
mx	0,523248706	0,523588	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249	0,523249
myx	1,017466969	1,017467	1,017807	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467	1,017467
mz	1,010659831	1,01066	1,01066	1,010999	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066	1,01066
myz	1,047898882	1,047899	1,047899	1,047899	1,048238	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899	1,047899
wz	0,211422509	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423	0,211626	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423	0,211423
MAx	207,2046563	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047	207,3717	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047	207,2047
MAz	207,2089198	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089	207,2589	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089	207,2089
Ax	52,2137572	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376	52,27776	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376	52,21376
Bx	25,13634591	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635	25,17115	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635	25,13635
Ay	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,030017	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
By	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,8176	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76
Az	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34517	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029	52,34029
Bz	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561	24,93579	24,93561	24,93561	24,93561	24,93561
K	0,98016195	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,980162	0,98167	0,980162	0,980162	0,980162
Rxy	0,989144139	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,989144	0,992521	0,989144	0,989144
Rzy	0,998991391	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	0,998991	1,001087	0,998991
Rep	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,015
w (x)	0,393722273	0,393467	0,393854	0,393855	0,393595	0,394102	0,39404	0,393627	0,392819	0,3942	0,393722	0,393722	0,393791	0,39372	0,393723	0,396251	0,392177	0,408722
$\sum u(x_i)$		0,000255	-0,00013	-0,00013	0,000128	-0,00038	-0,00032	9,5E-05	0,000903	-0,00048	6,95E-10	-7E-10	-6,9E-05	2,42E-06	-5,3E-07	-0,00253	0,001545	-0,015
$\sum u(x_i)^2$	0,0002352	6,52E-08	1,73E-08	1,75E-08	1,63E-08	1,44E-07	1,01E-07	9,02E-09	8,15E-07	2,28E-07	4,84E-19	4,83E-19	4,73E-09	5,84E-12	2,82E-13	6,4E-06	2,39E-06	0,000225
Mean value	0,393722273																	
u	0,015336236																	
U (k = 2)	0,030672472																	
Rel	7,8%																	

Figura 23 - Estimación de la incertidumbre de la fracción de masa de Cd en candidato a MRC por método Kragten

4.3.7 Evaluación del desempeño del método

Las cifras de mérito se presentan en la Tabla 15 y Tabla 16. En métodos normalizados, como lo propuestos por la Association of Official Analytical Collaboration (AOAC 2016) y para los niveles de fracción de masa considerados, se espera que dichas cifras se encuentren en los siguientes rangos: recuperación entre 80 y 115%, repetibilidad de un 11% y reproducibilidad de un 16%. Al comparar estos valores con los obtenidos en el método desarrollado, podemos observar que el grado de exactitud alcanzado es significativamente superior. En particular, la incertidumbre relativa expandida máxima fue del 5% para Cd y del 8% para el Pb, muy por debajo de los valores alcanzables con métodos normalizados basados en calibración externa. En vistas de su uso para la certificación de un MRC, se puede concluir que el método es adecuado al uso.

CADMIO				
Sensibilidad	200000 cps/ppb ¹¹⁴ Cd			
Rango Lineal	0,015 a 1000 ppb			
Límite de detección instrumental	0,005 ppb			
Límite de cuantificación método	0,0005 mg/kg			
	NIST SRM 1547 Peach Leaves w (mg/kg): 0,0261±0,0022	NIST SRM 3254 Green Tea w (mg/kg): 0,037±0,002	Muestra yerba mate w (mg/kg): 0,7	Muestra CCQM-K89 herba Ecliptae w (mg/kg): 4,12
Precisión repetibilidad (n=7)	3,7 %	1,9 %	1,0 %	0,23 %
Precisión – intermedia (n=3 días)	3,7 %	---	1,1 %	---
Veracidad – recuperación n=7	97 %	96 %	---	---
Incertidumbre expandida	5 %	5 %	4 %	3 %
Error normalizado	0,31	0,54		

Tabla 15 - Cifras de mérito del método desarrollado para la determinación de Cd

PLOMO			
Sensibilidad	1000000 cps/ppb ²⁰⁸ Pb		
Rango Lineal	0,01 a 1000 ppb		
Límite de detección instrumental	0,005 ppb		
Límite de cuantificación método	0,0003 mg/kg		
	NIST SRM 1547 Peach Leaves w (mg/kg): 0,869±0,018	Muestra yerba mate w (mg/kg): 0,4	Muestra CCQM-K89 herba Ecliptae w (mg/kg): 8,18
Precisión repetibilidad (n=7)	0,6%	7,3%	0,3%
Precisión – intermedia (n=3 días)	0,9%	7,4%	---
Veracidad – recuperación n=7	97%	---	---
Incertidumbre expandida	5%	8%	3%
Error normalizado	0,55		

Tabla 16 - Cifras de mérito del método desarrollado para la determinación de Pb

4.4 Desarrollo de la metodología para la determinación de arsénico por método de adición estándar con estándar interno con detección por ICP-SFMS

El método para la determinación de arsénico desarrollado se basa en la cuantificación por adición estándar (con preparación gravimétrica), en un punto con estándar interno y detección por ICP-SFMS. La ventaja de analizar arsénico utilizando un espectrómetro de masas de sector magnético en vez de uno de cuadrupolo es la capacidad de resolver las interferencias poliatómicas, principalmente la interferencia Ar-Cl tan abundante, para la cual se requiere una resolución de 7773, pero también las interferencias Ar-K (resolución 7761) y Ca-O-O (resolución 7761), entre otras.

4.4.1 Selección del estándar interno

La elección del estándar interno apropiado es crucial para garantizar la exactitud en la determinación de arsénico por ICP-MS. Al momento de elegir el estándar interno normalmente se busca que el mismo tenga una masa atómica y un potencial de ionización similar al analito, para asegurar que ambos elementos experimenten efectos similares durante la ionización y detección. En determinaciones de arsénico los elementos: galio, germanio e indio, son los más comúnmente utilizados como estándar interno. Si analizamos las masas atómicas y los potenciales de ionización, vemos que el Ga tiene un potencial de ionización de 5,999 eV ($m/z = 69$ y 71), el germanio de 7,900 eV ($m/z = 70, 72, 73, 74$ y 76), el arsénico de 9,815 eV ($m/z = 75$) y el indio de 5,786 eV ($m/z = 113$ y 115). Luego de analizados estos valores, buscando similitud de masa atómica y de potencial de ionización se decide emplear germanio. Dentro de los isótopos disponibles del germanio, aquellos que presentan menor influencia de interferencias, cuando son determinados en alta resolución, son el 72 y el 73. Como el isótopo 72 es prácticamente 4 veces más abundante que el 73, se decide probar en primera instancia este isótopo.

4.4.2 Adición de calibrante

(Zhu e Chiba 2012) evaluaron la cantidad óptima de solución estándar que debe añadirse a una muestra enriquecida para mejorar la precisión de la medición. Encontraron una mejora significativa de la precisión al aumentar la relación entre la fracción de masa de muestra adicionada y la muestra sin adicionar de 1,1 a 2,0, sin mejoras significativas para relaciones superiores: 3,0; 4,0; 5,0; 7,0 y 10,0. Concluyeron que trabajar con concentraciones de muestra sin adicionar y adicionada cercanas facilita la optimización de las condiciones de operación del ICP-MS y garantiza

mediciones más precisas, por lo que seleccionaron una relación de 2,0 para los experimentos posteriores.

Pero asegurar una relación de 2, significa conocer bien, a priori, la fracción de masa de analito en la muestra incógnita. Una subestimación inicial de la fracción de masa nos llevaría a tener una relación inferior a 2, con el posible detrimento de la exactitud de los resultados. Es por ello por lo que se decide trabajar con una relación de 3.

4.4.3 Ecuación de cálculo método de adición estándar en un punto con estándar interno.

$$w_{smp} = \frac{R * w_{cal} * m_{cal-FB} * m_{sln}}{m_{sln-FB} * m_{smp}} * FD \quad R = \frac{R_{FA}}{R_{FB} - R_{FA}} \quad Ec. 10$$

- w_x : fracción de masa del analito en la muestra.
- W_{cal} : fracción de masa del analito en el calibrante utilizado como spike.
- Fracción A: digesto o dilución del digesto para preparar la muestra adicionada.
- Fracción B: digesto o dilución del digesto adicionado.
- m_{cal-FB} : masa de calibrante en la fracción B.
- m_{sln-FB} : masa de la fracción A en la fracción B.
- m_{smp} : masa de muestra.
- m_{sln} : masa total del digesto.
- I_A : Intensidad de la señal del analito.
- I_{EI} : Intensidad de la señal del estándar interno.
- R_{FA} : S_A/S_{EI} en Fracción A.
- R_{FB} : S_A/S_{EI} en Fracción B.
- FD : Factor de dilución.

4.4.5 Evaluación de la incertidumbre

La incertidumbre fue estimada según (JCGM 100 2008). En la Tabla 17 se presentan las variables, el valor típico, la incertidumbre estándar de las variables y el cálculo para la estimación de la incertidumbre en la determinación de arsénico en la muestra

candidato a MRC. La incertidumbre expandida relativa resultante es de 5,1%. Realizando un análisis de las variables podemos observar que la componente de mayor influencia es la repetibilidad instrumental (82%), seguido de la precisión del método (12%).

Magnitud	Valor típico	Incertidumbre estándar	Coefficiente de Sensibilidad c_i	$(c_i \cdot u_i)^2$
m sln (g)	30,6700	0,00048	0,001785	7,24E-13
FD	1,0000	0,00000	0,054740	0
R	0,3589	0,00369	0,152509	3,16E-07
w CAL (mg/kg)	0,2889	0,000363	0,189504	4,73E-09
m CAL-FB (g)	0,2097	0,00048	0,261015	1,55E-08
m sln-FB (g)	12,2115	0,00048	-0,004483	4,56E-12
m smp (g)	0,9976	0,00048	-0,054869	6,84E-10
Repetibilidad (mg/kg)	0	0,00022	1	4,84E-08
Suma $(c_i \cdot u_i)^2$		3,85E-07		
U (mg/kg)			0,000621	
Glef			2,969364	
K			4,302653	
U (mg/kg)			0,00267	
Urel (%)			5,1	

Tabla 17 - Estimación de la incertidumbre de la fracción de masa de As en candidato A MRC según (JCGM 100 2008)

4.4.6 Evaluación del desempeño del método

En la Tabla 18 se muestran las cifras de mérito del método desarrollado. Para este nivel de fracción de masa, la AOAC presenta como cifras de mérito indicativas los siguientes valores: recuperación entre 60 y 115%, repetibilidad de un 15% y reproducibilidad de un 32%. Como se puede ver para el As la brecha entre las cifras obtenidas y los valores indicativos AOAC son aún más grandes que para el Cd y Pb. La incertidumbre relativa expandida máxima alcanzada fue del 5% y por lo tanto, se puede concluir que el método es adecuado al uso.

ARSÉNICO				
Sensibilidad	1498 cps/ppb			
Rango Lineal	0,05 a 1000 ppb			
Límite de detección instrumental	0,02 ppb			
Límite de cuantificación método	0,0015 mg/kg			
	Muestra yerba mate w (mg/kg): 0,05	NIST SRM 1547 Peach Leaves w (mg/kg): 0,062±0,014	NIST SRM 1570a Spinach Leaves w (mg/kg): 0,068±0,012	NIST SRM 3254 Green Tea w (mg/kg): 0,150±0,011
Precisión repetibilidad (n=7)	2,0 %	1,1 %	0,8 %	1,4 %
Precisión – intermedia	2,4 % (n=3)	1,6 % (n=2)	0,9 % (n=2)	3,4 % (n=2)
Veracidad – recuperación n=7	---	107 %	91 %	92 %
Incertidumbre expandida	5 %	3 %	3 %	3,5 %
Error normalizado	---	0,29	-0,53	-0,95

Tabla 18 - Cifras de mérito método desarrollado para As

4.5 Desarrollo de la metodología para la determinación de fósforo y sodio por método de adición estándar con detección por ICP-AES

Para la determinación de P y Na, el método desarrollado se basa en la cuantificación por adición estándar (con preparación gravimétrica), en un punto y detección por ICP-AES.

4.5.1 Elección de no utilizar estándar interno

En los instrumentos analíticos, la señal generada a partir de las propiedades químicas de una muestra siempre está acompañada por ruido, el cual puede tener componentes en un amplio rango de frecuencias que interfieren con la detección precisa del analito. Este ruido afecta la relación señal-ruido de manera distinta según su frecuencia. El ruido de alta frecuencia se asocia con fluctuaciones rápidas que degradan la precisión de una medición individual, mientras que el ruido de baja frecuencia, conocido comúnmente como deriva, se manifiesta como variaciones lentas en el fondo o la sensibilidad del instrumento, afectando la reproducibilidad entre mediciones sucesivas. Para mitigar estos efectos, el ruido de alta frecuencia suele corregirse mediante estrategias como la estandarización interna, mientras que el control del ruido de baja frecuencia requiere otros enfoques como por ejemplo recalibraciones frecuentes (Salit e Turk 1998).

El uso de estándar interno en un ICP-AES secuencial presenta limitaciones inherentes al diseño instrumental. En un sistema secuencial, la medida de cada línea espectral se realiza en distintos instantes de tiempo, no de manera simultánea. La función principal de un estándar interno consiste en corregir variaciones instantáneas en la intensidad de emisión provocadas por fluctuaciones del plasma, cambios de nebulización, deriva temporal o inestabilidad electrónica. Cuando la adquisición no es simultánea, la señal

del analito y la del estándar interno no responden a la misma condición instrumental exacta.

En un equipo ICP-AES secuencial, la secuencia de medición puede tardar segundos o minutos en recorrer todas las longitudes de onda programadas, a diferencia de los ICP-MS donde la velocidad de barrido es mucho más alta (ms), por lo tanto, la no correspondencia temporal entre ambas mediciones (analito y estándar interno) es mucho más marcada. Esto significa que la señal del estándar interno corresponde a un estado del plasma diferente al de la señal del analito. Entre la lectura de una línea y otra pueden ocurrir oscilaciones rápidas que quedan sin corregir. Esta asincronía quita poder al principio de compensación que hace útil al estándar interno. Es por lo ello, que se decide no utilizar estándar interno en la determinación de P y Na.

4.5.2 Selección de las longitudes de onda de medición

La determinación de fósforo por ICP-AES presenta retos específicos debido a su menor sensibilidad relativa en comparación con otros elementos. La longitud de onda más utilizada para el fósforo es 213,618 nm, ya que ofrece un balance entre sensibilidad y menor susceptibilidad a interferencias. Sin embargo, esta línea puede verse afectada en matrices que contienen altas concentraciones de elementos como hierro, aluminio o calcio, que pueden generar interferencias espectrales cercanas a esta longitud de onda. La línea de emisión a 177,495 nm, aunque menos sensible, puede ser útil en casos donde la longitud de onda principal no sea adecuada debido a interferencias. No obstante, la detección en esta región del espectro ultravioleta requiere un manejo cuidadoso del sistema óptico del instrumento, ya que estas longitudes de onda suelen ser más propensas al ruido de fondo y susceptibles a la degradación del rendimiento óptico.

El Na es un elemento altamente sensible en ICP-AES debido a la intensidad de sus líneas de emisión características. Las longitudes de onda más utilizadas para la determinación de Na son 588.995 nm y 589.592 nm, correspondientes al doblete de emisión. Estas líneas son muy intensas y permiten alcanzar bajos límites de detección, lo que las hace ideales para aplicaciones donde el Na está presente en trazas. Además, estas líneas suelen estar libres de interferencias en la mayoría de las matrices.

En base a lo comentado fue elegida la longitud de onda 213,618 nm para la determinación de fósforo y la longitud de onda 589,592 para la determinación de Na.

4.5.3 Uso de cloruro de cesio como buffer de ionización

En el plasma los elementos se ionizan debido a las altas temperaturas (~10,000 K). Sin embargo, la eficiencia de ionización de un elemento puede ser influenciada por otros componentes presentes en la muestra, como metales alcalinos o alcalinotérreos. Estos elementos tienen bajas energías de ionización y tienden a ionizarse fácilmente, modificando el equilibrio de ionización del plasma y afectando la señal del analito. Para solucionar este problema, se introducen buffers de ionización, que neutralizan los efectos de estos elementos y estabilizan el ambiente de ionización. El cloruro de cesio (CsCl) es uno de los buffers de ionización más efectivos utilizados en ICP-AES. El cesio tiene una energía de ionización muy baja (3,8939 eV), lo que lo convierte en un competidor eficiente para los procesos de ionización. Al introducir CsCl en el plasma, el cesio se ioniza preferentemente, desplazando el equilibrio de ionización de los demás elementos, aumentando la cantidad de átomos neutros disponibles para la excitación y por lo tanto favoreciendo la intensidad de la línea de emisión atómica.

Dado que para ambos analitos se seleccionaron líneas atómicas y el sodio es altamente susceptible a la ionización, se agregó CsCl a los digestos de las muestras y de los MRC de control, de modo que la concentración final en el digesto fuese de 10.000 ppm.

4.5.4 Ecuación de cálculo adición estándar en un punto

$$w_x = \frac{W_{CAL} \times m_{CAL-FB}}{(R \times m_{FB}) - m_{sln-FB}} * \frac{m_{sln}}{m_{smp}} * FD \quad EC. 11$$

- w_x : fracción de masa del analito en la muestra.
- W_{cal} : fracción de masa del analito en el calibrante utilizado como spike.
- Fracción A: digesto o dilución del digesto para preparar la muestra adicionada.
- Fracción B: digesto o dilución del digesto adicionado.
- m_{cal-FB} : masa de calibrante en la fracción B.
- m_{sln-FB} : masa de la alícuota de la fracción A en la fracción B.
- m_{FB} : masa de la fracción B.
- m_{smp} : masa de muestra.
- m_{sln} : masa total del digesto.
- I_{FA} : Intensidad de la señal del analito en la Fracción A.
- I_{FB} : Intensidad de la señal del analito en la Fracción B.
- R : I_{FB}/I_{FA}
- FD : Es el factor de dilución.

4.5.5 Evaluación del desempeño del método

En la Tabla 19 se pueden observar las cifras de mérito del método desarrollado para la determinación de fósforo. Una vez más las cifras obtenidas son mejores a los valores indicativos AOAC para el nivel de fracción de masa en estudio (recuperación entre 95 y 105%, repetibilidad de 3,7% y precisión intermedia igual a 6%). La incertidumbre relativa expandida del método fue de 3% y por lo tanto se concluye que el método es adecuado al uso.

Las cifras de mérito del método para la determinación de sodio se muestran en la Tabla 20. Los valores de repetibilidad y precisión intermedia fueron inferiores a los valores indicativos AOAC para esta fracción de masa (repetibilidad igual a 7,3%, precisión

intermedia igual a 8%). Para este caso no fue posible evaluar la veracidad y la exactitud del método, dado que no fue posible encontrar un MRC en matriz vegetal con valor certificado para sodio. El MRC utilizado para los estudios de precisión, NIST 1547 Peach leaves, cuenta con un valor informativo para sodio, sobre el cual se obtuvo una recuperación del 145%. Al ser este valor muy por fuera de lo indicado en el certificado, se procedió a realizar una cuantificación de este MRC por FAAS con calibración externa, a modo de verificación del valor. Utilizando esta metodología se obtuvo una recuperación del 138% y por tanto fue confirmada la gran diferencia entre el valor indicativo del material y los valores encontrados en el laboratorio, sea aplicando adición estándar y detección por ICP-AES que para calibración externa y detección por FAAS. Esto evidencia la gran necesidad de contar con MRCs con valores certificados y la incompatibilidad de usar valores indicativos para estudios de veracidad y exactitud.

En función de la situación planteada para sodio, se decide utilizar los resultados de la comparación interlaboratorio organizada como objetivo de la tesis, para evaluar la exactitud del método.

FÓSFORO		
Sensibilidad	4800 cps/ppm	
Rango Lineal	0,03 a 100 ppm	
Límite de detección instrumental	0,01 ppm	
Límite de cuantificación método	0,9 mg/kg	
	NIST SRM 1547 Peach Leaves w: 1371 mg/kg	Muestra yerba mate w: 1573 mg/kg
Precisión repetibilidad (n=7)	0,4 %	1,2 %
Precisión – intermedia (n=3 días)	0,6 %	2,3 %
Veracidad – recuperación (n=7)	102 %	---
Incertidumbre expandida	3 %	3 %
Error normalizado	0,26	---

Tabla 19 - Cifras de mérito método desarrollado para P

SODIO		
Sensibilidad	247000 cps/ppm	
Rango Lineal	0,015 a 50 ppm	
Límite de detección instrumental	0,005 ppm	
Límite de cuantificación método	0,45 mg/kg	
	Muestra yerba mate w: 32 mg/kg	NIST SRM 1547 Peach Leaves w: 37 mg/kg (valor informativo)
Precisión repetibilidad (n=7)	1,3 %	2,5 %
Precisión – intermedia (n=3 días)	2,5 %	4,8 %
Veracidad – recuperación	---	---
Incertidumbre expandida	3 %	3 %
Error normalizado	---	---

Tabla 20 - Cifras de mérito método desarrollado para Na

4.6 Evaluación de la homogeneidad del lote

La homogeneidad del lote fue estudiada de acuerdo con (ISO 35 2017). Diez botellas del lote fueron seleccionadas: la primera (N° 1), la última (N° 117) y las 8 restantes de manera aleatoria. Se realizaron las determinaciones de los 5 elementos por triplicado con los métodos desarrollados. Para el caso del Pb se detectó un valor anómalo en la réplica 1 de la botella 117. Su calidad de anómalo fue confirmada mediante un test Tukey (Figura 24) y fue descartado para la posterior evaluación de la homogeneidad.

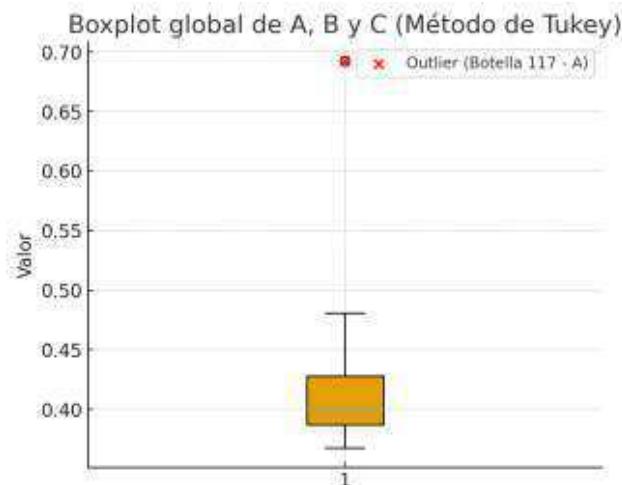


Figura 24 – Representación gráfica de la prueba de Tukey para valores anómalos en los resultados de Pb para evaluación de la homogeneidad

En la Figura 25, Figura 26, Figura 27, Figura 28 y Figura 29 se resumen los resultados obtenidos en las determinaciones realizadas en cada botella.

Se realizó la evaluación mediante un análisis ANOVA. Los resultados se pueden observar en la Tabla 21. Para los cinco analitos evaluados, el ensayo de homogeneidad arrojó resultados satisfactorios, confirmando la ausencia de diferencias significativas entre las unidades del lote. Se concluye que la muestra es lo suficientemente homogénea como para proceder con la certificación del lote.

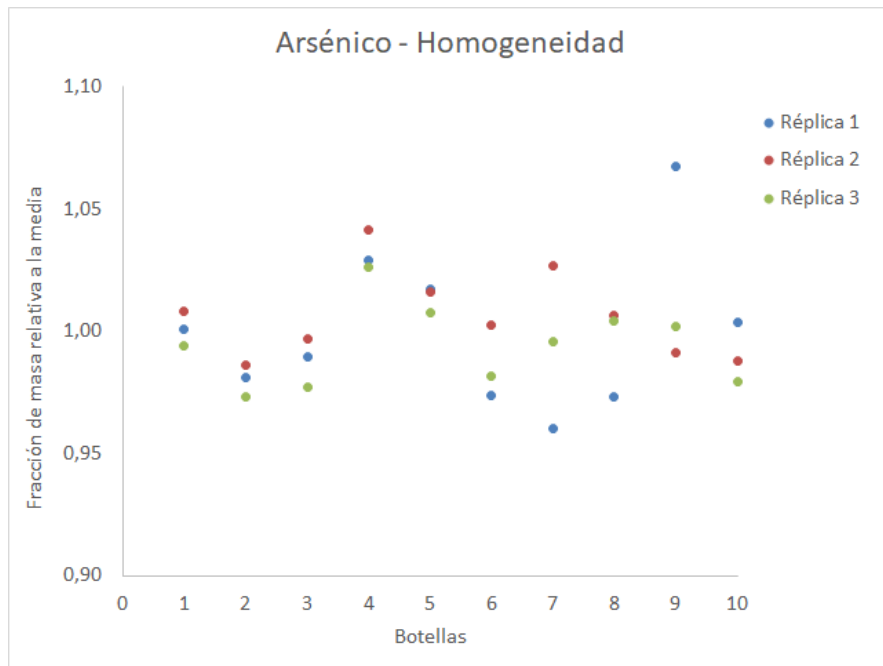


Figura 25 - Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de As en el candidato a MRC

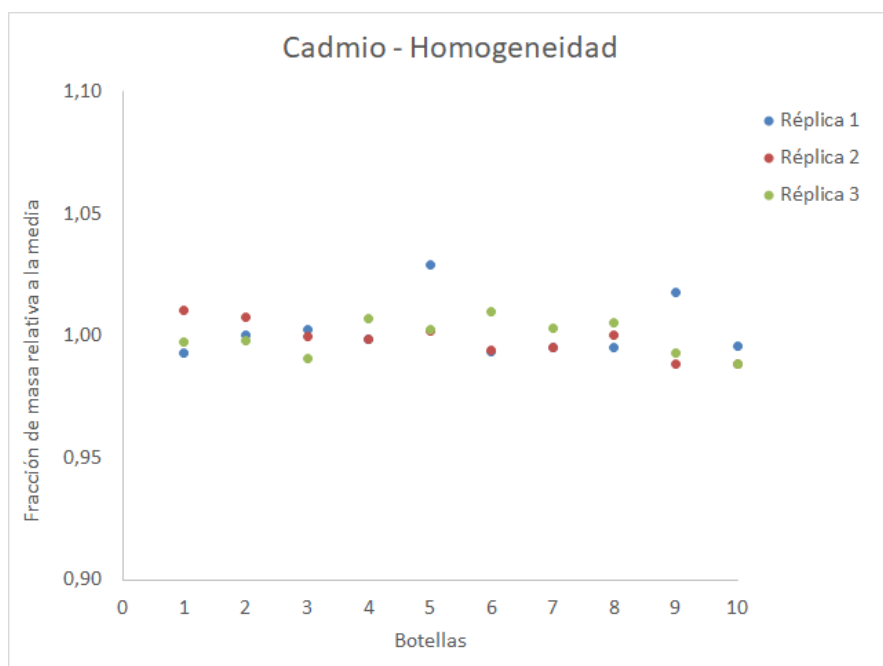


Figura 26 – Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de Cd en el candidato a MRC

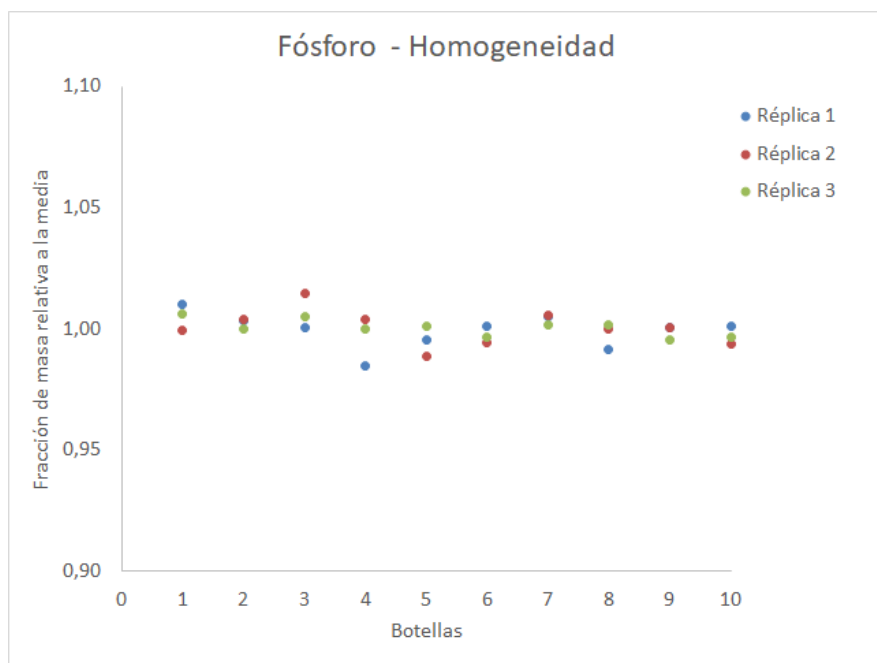


Figura 27 - Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de P en candidato a MRC

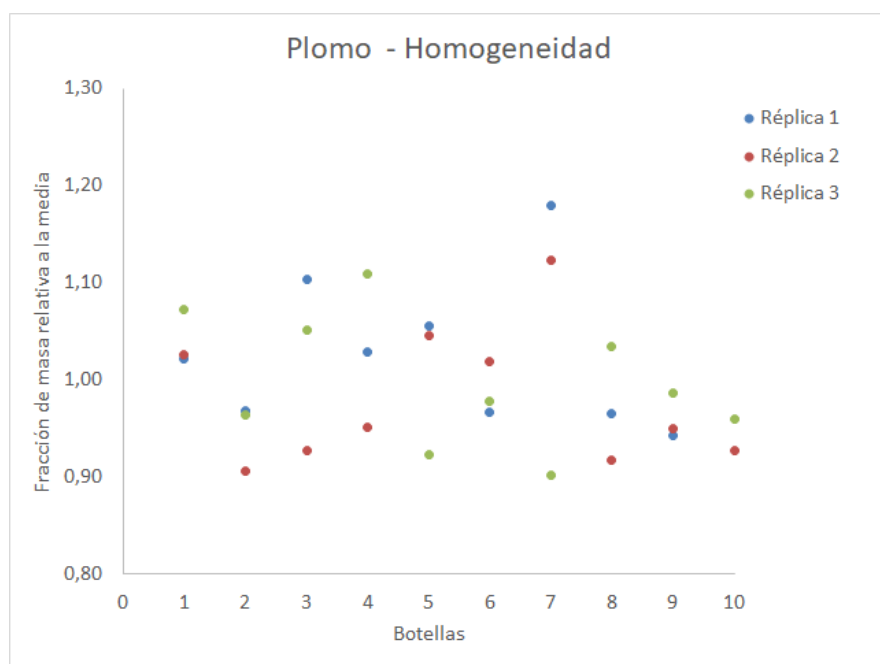


Figura 28 – Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de Pb en candidato a MRC

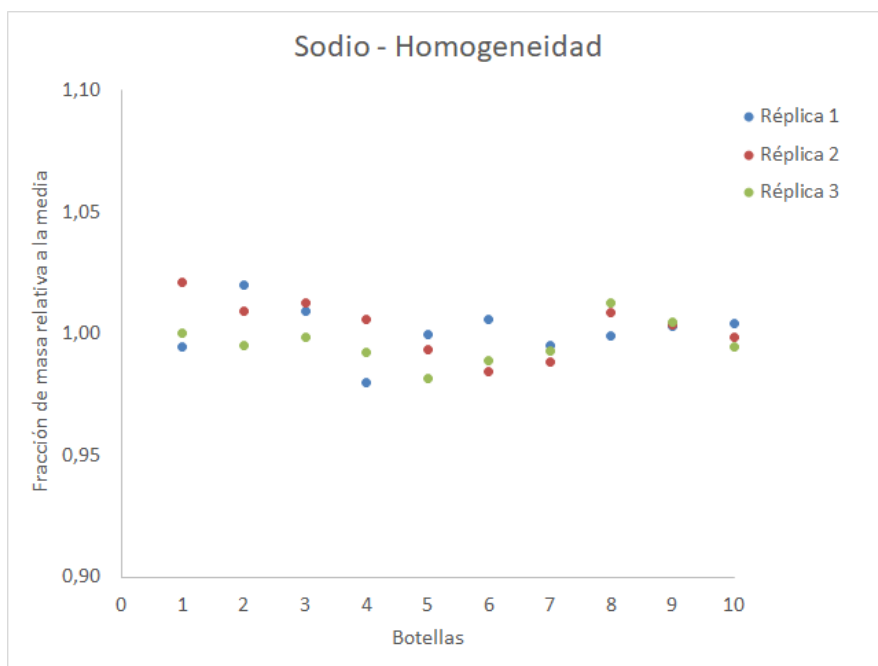


Figura 29 – Resultados de la homogeneidad de la fracción de masa de Na en candidato a MRC

Elemento	F	F crítico	Resultado	ubb
As	2,20	2,39	Homogéneo	2,3%
Cd	0,96	2,39	Homogéneo	0,9%
P	1,75	2,39	Homogéneo	0,6%
Pb	1,03	2,42	Homogéneo	7,2%
Na	1,67	2,39	Homogéneo	1,0%

Tabla 21 - Resultado del ANOVA para la evaluación de la homogeneidad

4.7 Evaluación de la estabilidad del lote en condiciones de transporte

Para evaluar la posible inestabilidad de la muestra durante el transporte debido al efecto de la temperatura, se realizó un estudio isócrono, de acuerdo con (ISO 35 2017), para un período de tres semanas a 40 °C. Cada semana se sacaron de la estufa dos botellas seleccionadas al azar y restituidas en condiciones de almacenamiento normales (20 ± 5 °C). Una vez finalizadas las 3 semanas, las botellas fueron analizadas

empleando los métodos desarrollados. Realizando un análisis de regresión de las fracciones de masa de los distintos elementos en función del tiempo, se evaluó la significancia estadística de las pendientes mediante una prueba t. Si la pendiente no difiere significativamente de 0, el candidato a MRC se considera estable en las condiciones de transporte ensayadas.

El estadístico fue calculado como:

$$t_b = \frac{|b|}{s_b} \quad \text{Ec. 12}$$

donde b corresponde a la pendiente estimada de la recta de regresión, s_b representa el error estándar asociado a dicha estimación. El valor calculado de t_b se compara con el valor crítico de la distribución t de Student para una prueba bilateral con n-2 grados de libertad, al 95 % de nivel de confianza. Si el estadístico t_b excede el valor crítico, se concluye que la pendiente es significativamente distinta de cero, lo que indica que el modelo de regresión refleja una relación lineal significativa entre la variable independiente y la variable dependiente al 95 % de nivel de confianza. Los resultados se resumen en la Tabla 22.

Elemento	t calculado	t crítico	Resultado
As	0,676	2,571	Estable
Cd	1,196	2,571	Estable
Na	0,176	2,571	Estable
P	1,038	2,571	Estable
Pb	1,564	2,571	Estable

Tabla 22 – Resultados del estudio de estabilidad a corto plazo (condiciones de transporte)

Se puede concluir que los analitos no mostraron una inestabilidad significativa después de haber sido expuestos a 40 °C durante 3 semanas.

Si bien no es indispensable, de todas maneras, una componente de incertidumbre debida a la inestabilidad en condiciones de transporte será incorporada a la incertidumbre final del MRC. Esta componente fue estimada como:

$$u_{sts} = s_b * t \quad Ec. 13$$

Donde t es el tiempo de exposición igual a 3 semanas.

4.8 Estudio de estabilidad a largo plazo

Para el estudio de estabilidad a largo plazo se utilizó el mismo enfoque que para el estudio de estabilidad a corto plazo, evaluando la fracción de masa de los elementos a lo largo del tiempo. Como tiempo 0 se consideró los resultados obtenidos para la caracterización. Luego se repitieron las determinaciones en dos períodos más, alrededor de las semanas 147 y 213.

Los resultados del test estadístico se resumen en la Tabla 23.

Elemento	t calculado	t crítico	Resultado
As	1,415	2,776	Estable
Cd	0,138	2,365	Estable
Na	1,547	2,776	Estable
P	1,925	2,265	Estable
Pb	1,081	2,201	Estable

Tabla 23 - Resultados estudio de estabilidad a largo plazo

La incertidumbre por estabilidad a largo plazo fue como:

$$u_{lts} = s_b * t \quad Ec. 14$$

Donde t es el tiempo estimado desde la determinación para asignar el valor y el tiempo final estimado para la certificación. En este caso se utilizó como tiempo 312 semanas, haciendo una proyección de vida útil del MRC equivalente a 6 años.

4.9 Estudio Interlaboratorio

Los estudios interlaboratorio constituyen una herramienta fundamental para la evaluación del desempeño analítico, la armonización de métodos y la demostración de la competencia técnica de los laboratorios. Su desarrollo se sustenta en la necesidad de comparar resultados obtenidos por diferentes organizaciones, bajo condiciones controladas, con el objetivo de detectar sesgos sistemáticos, estimar la reproducibilidad y en última instancia, fortalecer la confiabilidad de las mediciones.

Un estudio interlaboratorio consiste, en términos generales, en la organización, ejecución y evaluación de ensayos o mediciones en los que participan múltiples laboratorios, que analizan muestras con suficiente grado de homogeneidad y estabilidad durante el período de distribución y análisis.

La homogeneidad se evalúa mediante un muestreo estadísticamente representativo, mientras que la estabilidad se verifica en diferentes intervalos de tiempo en condiciones de almacenamiento y transporte. Los estudios de homogeneidad y estabilidad aseguran que las diferencias observadas en los resultados se atribuyan a variaciones en los métodos o en la ejecución de los laboratorios y no a irregularidades en las muestras.

El laboratorio coordinador también se encarga de la recopilación y tratamiento estadístico de los datos. Este enfoque permite evaluar la exactitud de los resultados, a través del análisis de la variabilidad interlaboratorio y la comparación con valores de referencia cuando estos están disponibles.

Los estudios interlaboratorio pueden tener diferentes propósitos, y de ello depende en gran medida su diseño. En los programas de ensayos de aptitud, el objetivo principal es evaluar y monitorear el desempeño individual de los laboratorios participantes, siendo la participación uno de los requisitos de la ISO 17025.

En cambio, en los estudios destinados a la validación de métodos, el énfasis está en evaluar la reproducibilidad y robustez del procedimiento analítico, lo que implica un análisis más detallado de los factores que contribuyen a la variabilidad.

Por otro lado, en el ámbito de la Metrología, las comparaciones interlaboratorio del tipo “Key comparison” o “Supplementary comparison” se utilizan para demostrar la equivalencia de las mediciones realizadas por diferentes Institutos de Metrología y para establecer CMCs (Calibration and Measurement Capabilities) en el marco del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo del CIPM (International Committee for Weights and Measures).

El análisis estadístico de los datos constituye la etapa central de un estudio interlaboratorio. En general, se emplean métodos robustos que minimizan la influencia de valores atípicos y proporcionan estimaciones confiables de la media y la desviación estándar entre laboratorios. La norma (ISO 13528 2022) “Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison”, describe procedimientos estadísticos para el tratamiento de datos en programas de ensayos de aptitud, incluyendo la determinación de valores asignados, la estimación de la desviación estándar para la evaluación del desempeño y el cálculo de estadísticas robustas como la mediana y el rango intercuartílico.

Para el caso de las comparaciones clave en Metrología Química, se han comenzado a utilizar enfoques estadísticos que contemplan otros factores, como por ejemplo la “incertidumbre oscura” (Possolo, et al. 2021).

Como forma de evaluar la exactitud de los métodos desarrollados se propuso organizar un estudio interlaboratorio. Este estudio fue planteado en el marco de las actividades del grupo de Metrología Química del Sistema Interamericano de Metrología (<https://sim-metrologia.org/>). Los laboratorios deben participar utilizando sus mejores métodos disponibles, de forma de reportar incertidumbres lo más bajas

posible, que representen sus mejores capacidades de medición. Por ello, el participar requiere de una gran inversión y por tanto se concuerda la cantidad de analitos a determinar. En este caso se concordó excluir al Pb del estudio, por entenderse, para este estudio, su determinación presenta ciertas similitudes con la determinación de Cd. La Intercomparación fue codificada como SIM.QM-S11 “Supplementary Comparison for elements in Yerba mate (*Ilex paraguariensis*)”. Catorce laboratorios de 4 continentes aportaron resultados para 1 o más analitos.

La participación satisfactoria en una comparación de este tipo permite a los laboratorios declarar o mantener capacidades de medición de acuerdo con el CIPM MRA (*International Committee for Weights and Measures Mutual Recognition Arrangement*).

Los resultados de la comparación se encuentran publicados en (Pérez Zambra, et al. 2025) y en la página web del Buró Internacional de pesas y medidas <https://www.bipm.org/>, en el apartado KCDB (*Key comparisons data base*).

4.9.1 Participantes

La lista de participantes que aportaron resultados se resume en la Tabla 24.

Laboratorio	Acrónimo	País
Centro Nacional de Metrología	CENAM	México
National Laboratory of Chemical Metrology / General Chemical State Laboratory – Hellenic Institute of Metrology	EXHM	Grecia
Health Sciences Authority	HSA	Singapore
Instituto Nacional de Calidad	INACAL	Perú
Instituto Nacional de Metrología de Colombia	INMC	Colombia
Instituto Nacional de Metrología, Qualidade e Tecnologia	INMETRO	Brasil
Instituto Nacional de Tecnología Industrial	INTI	Argentina
Instituto de Salud Pública de Chile	ISP	Chile
Jožef Stefan Institute	JSI	Eslovenia
Laboratorio Tecnológico del Uruguay	LATU	Uruguay
Laboratorio Costarricense de Metrología	LCM	Costa Rica
National Institute of Metrology Thailand	NIMT	Tailandia
National Metrology Institute of South Africa	NMISA	Sudáfrica
Ural Research Institute for Metrology - Affiliated branch of the D.I. Mendeleyev Institute for Metrology	VNIIM- UNIIM	Rusia

Tabla 24 - Participantes del estudio interlaboratorio

4.9.2 Resultados informados

En la Figura 30, Figura 31, Figura 32 y Figura 33 se presentan los resultados informados por los participantes.

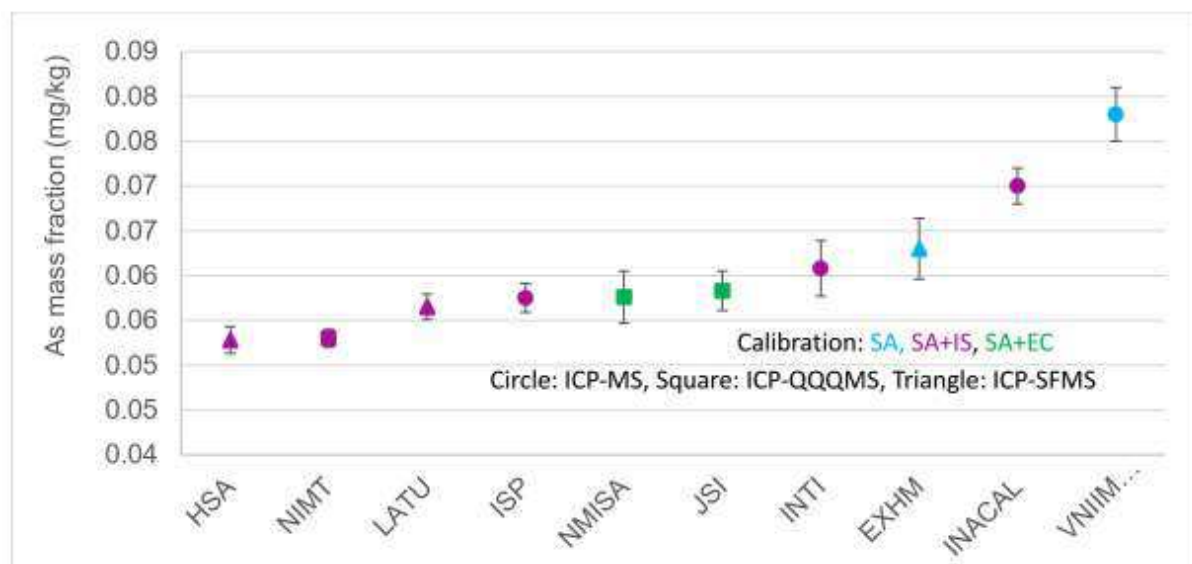


Figura 30 - Resultados reportados para fracción de masa de Arsénico (Pérez Zambra, et al. 2025)

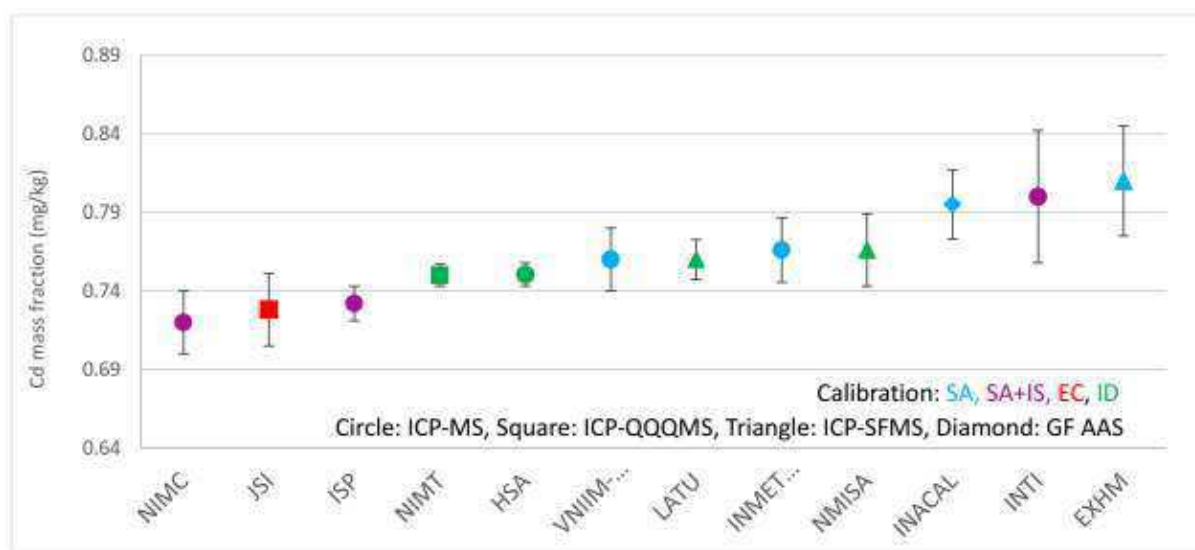


Figura 31 - Resultados reportados para fracción de masa de Cd (Pérez Zambra, et al. 2025)

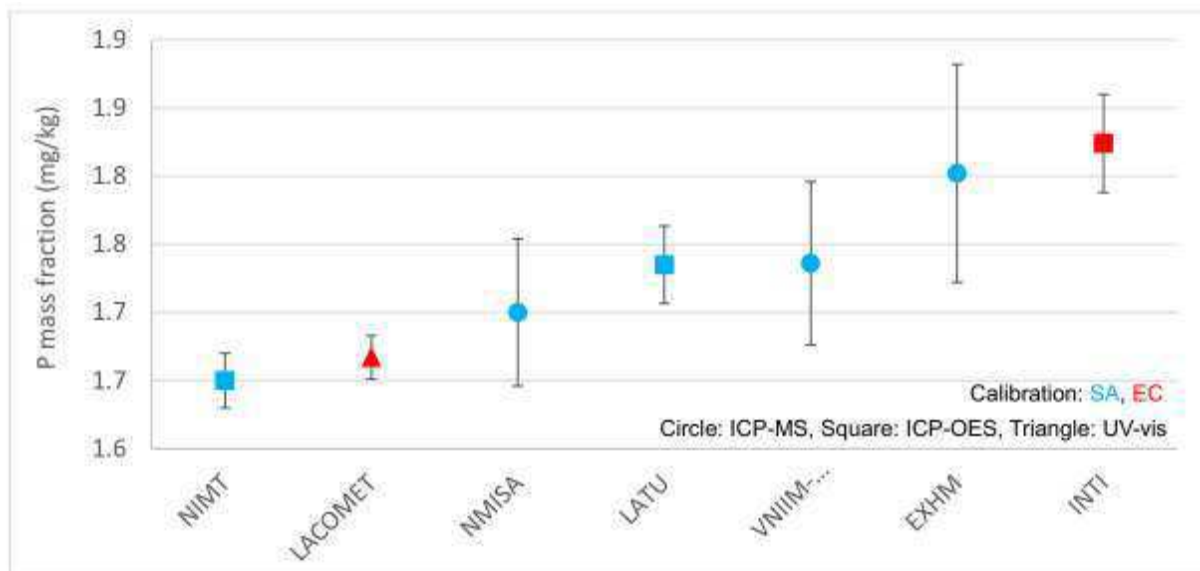


Figura 32 - Resultados reportados para fracción de masa de P (Pérez Zambra, et al. 2025)

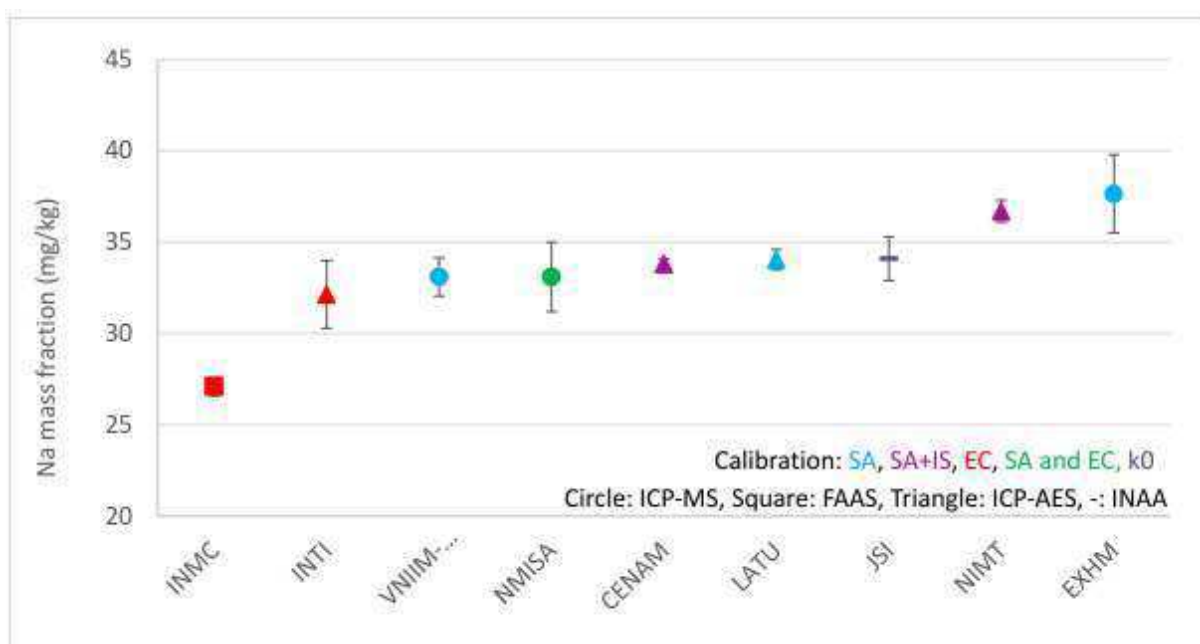


Figura 33 - Resultados reportados para fracción de masa de Na (Pérez Zambra, et al. 2025)

4.9.3 Estimación del valor de referencia

La elección del mejor estimador como valor de referencia fue realizada utilizando la plataforma NIST Decision Tree (Possolo, et al. 2021), disponible en <https://decisiontree.nist.gov/>.

El Árbol de Decisión consta de cuatro nodos de ramificación y cinco hojas (Figura 34), cada una asociada a un procedimiento de reducción de datos sustentado en un modelo estadístico específico. Su función es guiar el análisis de resultados de intercomparaciones, mediante preguntas secuenciales que conducen a la elección de un procedimiento apropiado. Los principios rectores enfatizan que un valor atípico no debe ser excluido únicamente por su distancia de la media y que ningún resultado debe dominar el consenso de forma automática por tener una incertidumbre pequeña. Además, los métodos de medición deben estar suficientemente caracterizados y las estimaciones de las incertidumbres deben estar sustentadas en un modelo estadístico explícito que considere todas las fuentes de incertidumbre y que satisfaga un criterio de optimalidad alineado con el objetivo de la intercomparación. Asimismo, se subraya la importancia de reconocer y propagar la “incertidumbre oscura”, es decir, la dispersión observada mayor a la esperada según las incertidumbres reportadas, para evitar subestimaciones en los DoEs (grados de equivalencia) (Possolo, et al. 2021).

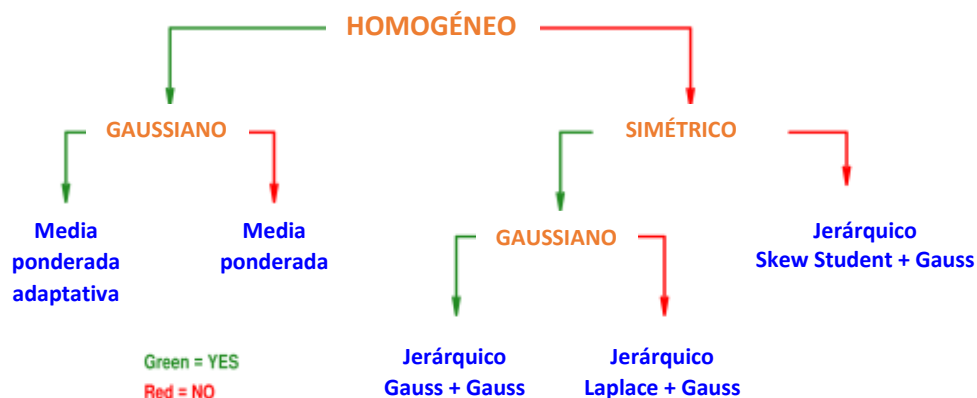


Figura 34 - Árbol de decisión. Adaptado (Possolo, et al. 2021)

La Tabla 25 resume los resultados obtenidos luego de aplicar el Árbol de Decisión en los resultados del Interlaboratorio, evaluando la homogeneidad de los datos (Cochran's test), su simetría (Miao-Gel-Gastwirth test) y la normalidad (Shapiro-Wilk) y en función de ello, el algoritmo más adecuado para el cálculo del valor de consenso.

En el caso del As, los resultados no fueron homogéneos ni simétricos, por lo cual el algoritmo seleccionado fue Jerárquico Skew Student-Gauss, que permite manejar distribuciones asimétricas y no homogéneas. El valor de consenso obtenido fue 0,0575 mg/kg con una incertidumbre asociada de 0,0026 mg/kg. Esto evidencia que, aunque los datos no cumplen con los supuestos estadísticos básicos, el método robusto empleado permitió establecer un valor de consenso confiable.

Para el Cd los resultados fueron homogéneos y normales. El valor de consenso se calculó mediante el algoritmo Media Ponderada Adaptativa, que pondera los resultados de acuerdo con su incertidumbre y estabilidad. El valor final fue 0,7526 mg/kg con una incertidumbre de 0,0054 mg/kg. Este resultado indica una buena consistencia interlaboratorio, con baja dispersión relativa.

Los resultados para P no fueron homogéneos, pero sí simétricos y normales. Dado que la homogeneidad no se cumplió, se recurrió al algoritmo robusto Jerárquico Gauss-Gauss, que permite manejar situaciones donde la dispersión no es completamente uniforme entre laboratorios. El valor de consenso obtenido fue 1738 mg/kg, con una incertidumbre de 23 mg/kg, lo cual refleja un ajuste estadísticamente aceptable pese a la heterogeneidad inicial.

En el caso del Na los datos no fueron homogéneos ni normales, aunque sí simétricos. Por lo tanto, el valor de consenso se determinó mediante el algoritmo Jerárquico Laplace-Gauss, que es apropiado para distribuciones con colas más pesadas y ausencia de normalidad. El valor obtenido fue 33,46 mg/kg con una incertidumbre de 0,66

mg/kg. Esto confirma que, aun en presencia de datos no normales, fue posible establecer un consenso robusto.

La elección del algoritmo estadístico de consenso depende críticamente de las propiedades de la distribución de los datos. La aplicación de procedimientos jerárquicos y robustos asegura que, incluso en condiciones de heterogeneidad o no normalidad, los valores de consenso obtenidos mantienen validez metrológica y pueden utilizarse como base para la evaluación de desempeño en el interlaboratorio.

	HOMOEGENIDAD (Test de Cochran)	SIMETRÍA (Test de Miao-Gel-Gastwirth)	NORMALIDAD (Test de Shapiro-Wilk)	METODOLOGÍA A APLICAR	Valor (mg/kg)	u (mg/kg)
As	NO	NO	---	Jerárquico Skew Student + Gauss	0,0575	0,0026
Cd	SI	---	SI	Media ponderada adaptativa	0,7526	0,0054
P	NO	SI	SI	Jerárquico Gauss + Gauss	1738	23
Na	NO	SI	NO	Jerárquico Laplace + Gauss	33,46	0,66

Tabla 25 – Resultados de la evaluación de la homogeneidad, simetría y normalidad de los resultados y valor de consenso obtenido en la Intercomparación

4.9.4 Evaluación de la performance de los métodos desarrollados

	Valor informado*	u (mg/kg)	di (mg/kg)	U(di)	d/U(di)
As	0,0565	0,0014	-0,0010	0,0066	-0,1517
Cd	0,760	0,013	0,0074	0,0379	0,1954
P	1735	26	-3,0	72,4	-0,0415
Na	34,05	0,55	0,59	1,73	0,342

Tabla 26 - Evaluación de la performance de los métodos desarrollados a partir del Interlaboratorio

*Valores expresados en base seca.

La Tabla 26 presenta la evaluación de la performance de los métodos desarrollados a partir de la comparación de los valores informados con respecto a los valores de referencia. Siendo d_i la diferencia entre el valor reportado y el valor de referencia y $U(d_i)$, la incertidumbre expandida de la diferencia. A continuación, se discuten los resultados obtenidos:

As: el valor informado (0,0565 mg/kg) muestra una diferencia negativa mínima ($d_i = -0,0010$ mg/kg), con una relación $d/U(d_i) = -0,1517$. Dado que este valor se encuentra muy por debajo del umbral crítico ($|d/U(d_i)| \leq 1$), puede concluirse que no existe sesgo significativo y que el método desarrollado es adecuado para la cuantificación de As.

Cd: el valor informado (0,760 mg/kg) presenta una diferencia positiva de 0,0074 mg/kg, con $d/U(d_i) = 0,1954$. Al igual que en el caso anterior, la relación $|d/U(d_i)|$ está muy por debajo de 1, lo que evidencia que el resultado es estadísticamente compatible con el valor de referencia y, por lo tanto, el método desarrollado es confiable para la determinación de Cd.

P: se observa una diferencia de $-3,0$ mg/kg respecto al valor informado (1735 mg/kg), con un resultado de $d/U(di) = -0,0415$ dentro de la zona de aceptación, confirmando que el método desarrollado es válido para la determinación de P.

Na: El valor informado (34,05 mg/kg) muestra una diferencia positiva de 0,59 mg/kg y un $d/U(di) = 0,342$. Al encontrarse por debajo del umbral de aceptación, se demuestra la consistencia y exactitud del método desarrollado también en este caso.

En conjunto, los resultados evidencian que para todos los analitos evaluados los valores de $d/U(di)$ se encuentran muy por debajo de 1, lo que confirma la ausencia de sesgo significativo. Esto valida el desempeño de los métodos propuestos y respalda su aplicabilidad en la determinación de los elementos evaluados en la matriz yerba mate u otra matriz vegetal con alto contenido de sílice.

4.10 Asignación del valor al MRC

Para la asignación del valor al MRC se tomaron dos estrategias. En el caso del Pb, el valor asignado es el obtenido por el método desarrollado, siendo en este caso el método basado en dilución isotópica considerado método primario por el BIPM. Para los elementos que formaron parte de la Intercomparación (As, Cd, Na y P) el valor asignado es establecido considerando tanto el valor obtenido mediante el método desarrollado (resultado A) como el valor obtenido por el consenso de los laboratorios participantes en el interlaboratorio (resultado B). No obstante, al calcular el valor de consenso interlaboratorio (resultado B), se excluyó deliberadamente el propio resultado A. Esta decisión se adoptó para evitar que dicho resultado influyera doblemente en el valor asignado y prevenir la generación de covarianzas entre ambos términos. Asimismo, se excluyeron los resultados de laboratorios cuyo desempeño no fue satisfactorio.

$$valor\ asignado\ MRC = \frac{resultado\ A + resultado\ B}{2} \quad Ec. 14$$

La incertidumbre fue estimada de acuerdo con la ecuación Ec. 15, donde fue tomada en cuenta la incertidumbre de los resultados individuales y la incertidumbre del sesgo entre los métodos, considerando una distribución rectangular.

$$u_{Caracterización,As,Cd,Na\ y\ P} = \sqrt{\frac{u_A}{2} + \frac{u_B}{2} + \frac{|resultado_A - resultado_B|}{2 * \sqrt{3}}} \quad Ec. 15$$

Para determinar el valor de consenso de los laboratorios participantes se utilizó la misma estrategia que para la Intercomparación: plataforma NIST Decision Tree (Possolo, et al. 2021). La Tabla 27 resume los resultados. Asimismo en la Figura 35, Figura 36, Figura 37 y Figura 38 podemos visualizar la total correspondencia entre los valores para los métodos desarrollados y los valores obtenidos por consenso.

	HOMOGENEIDAD (Test de Cochran)	SIMETRÍA (Test de Miao-Gel-Gastwirth)	NORMALIDAD (Test de Shapiro-Wilk)	METODOLOGÍA A APLICAR	Valor (mg/kg)	u (mg/kg)
As	NO	SI	SI	Jerárquico Gauss-Gauss	0,0571	0,0013
Cd	SI	---	SI	Promedio ponderado adaptativo	0,7520	0,0060
P	NO	SI	SI	Jerárquico Gauss-Gauss	1739	30
Na	SI	---	SI	Media ponderada adaptativa	33,78	0,25

Tabla 27 - Resultados valor de consenso Intercomparación para caracterización del MRC

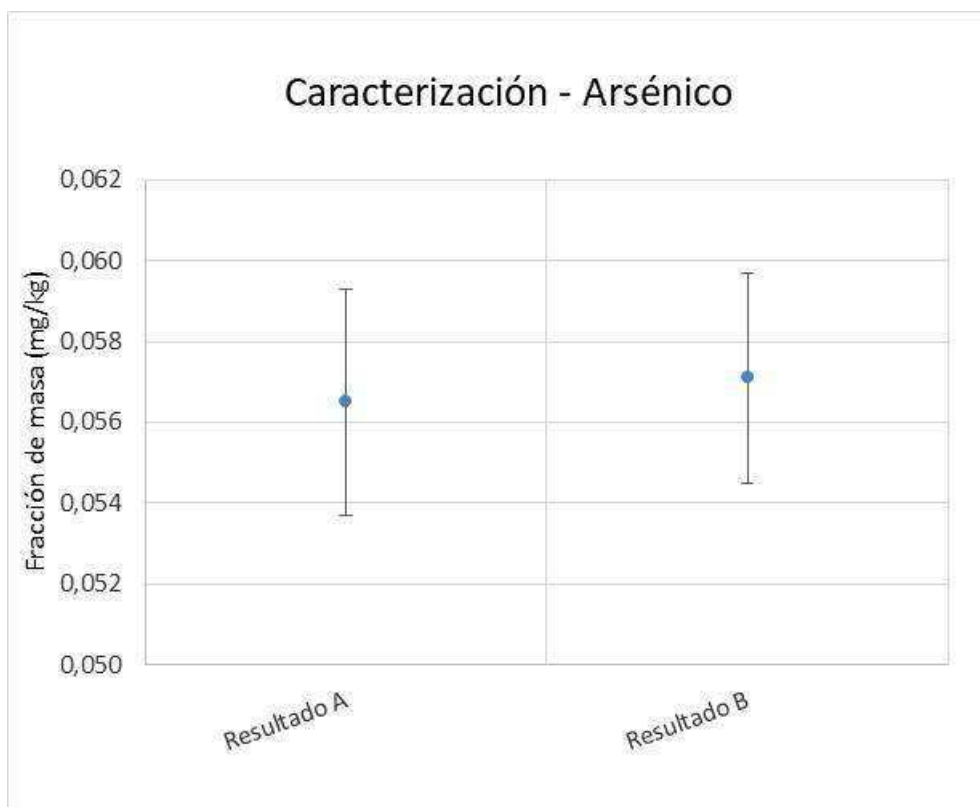


Figura 35 - Comparación de resultados para caracterización de As en el MRC

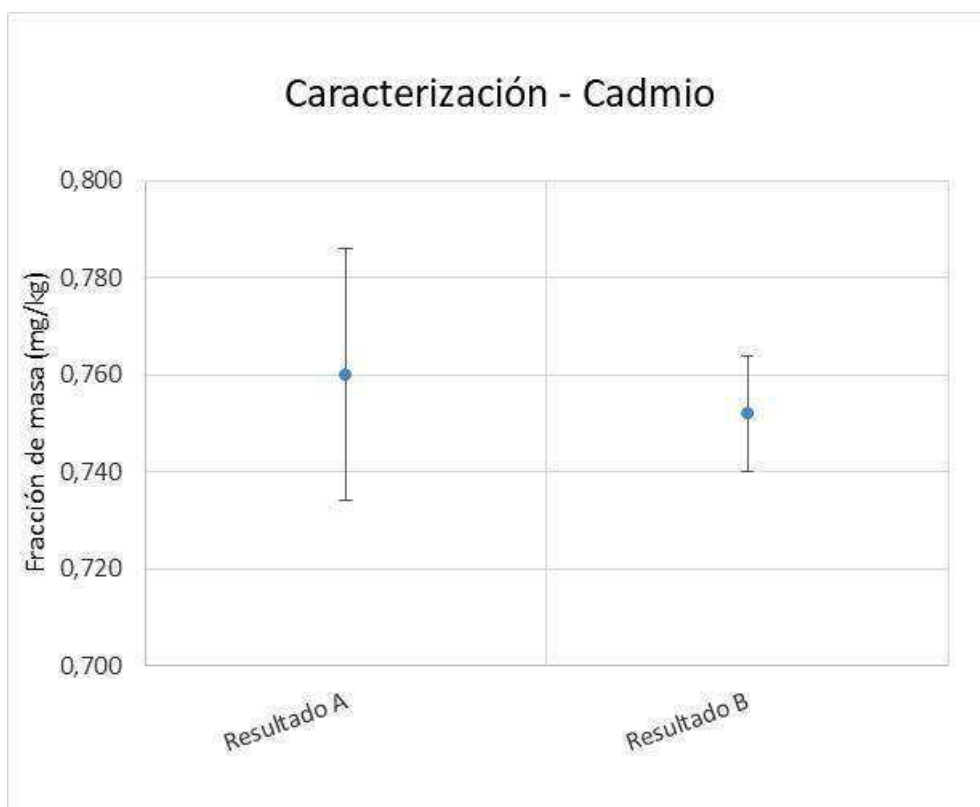


Figura 36 - Comparación de resultados para caracterización de Cd en el MRC

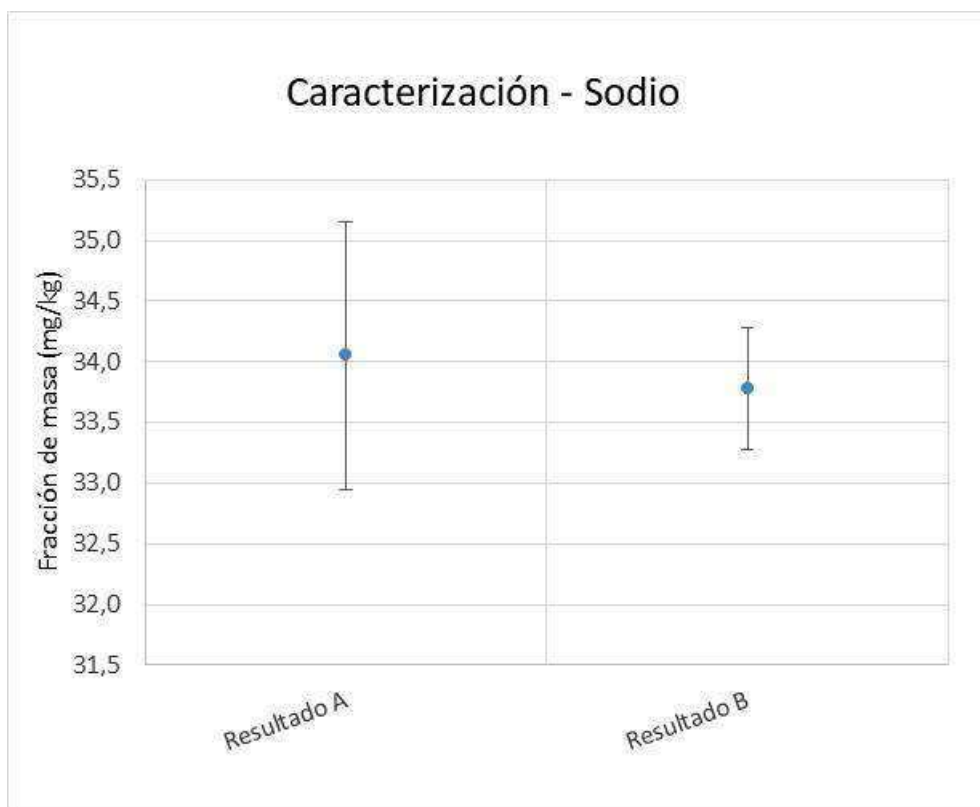


Figura 37 - Comparación de resultados para caracterización de Na en el MRC

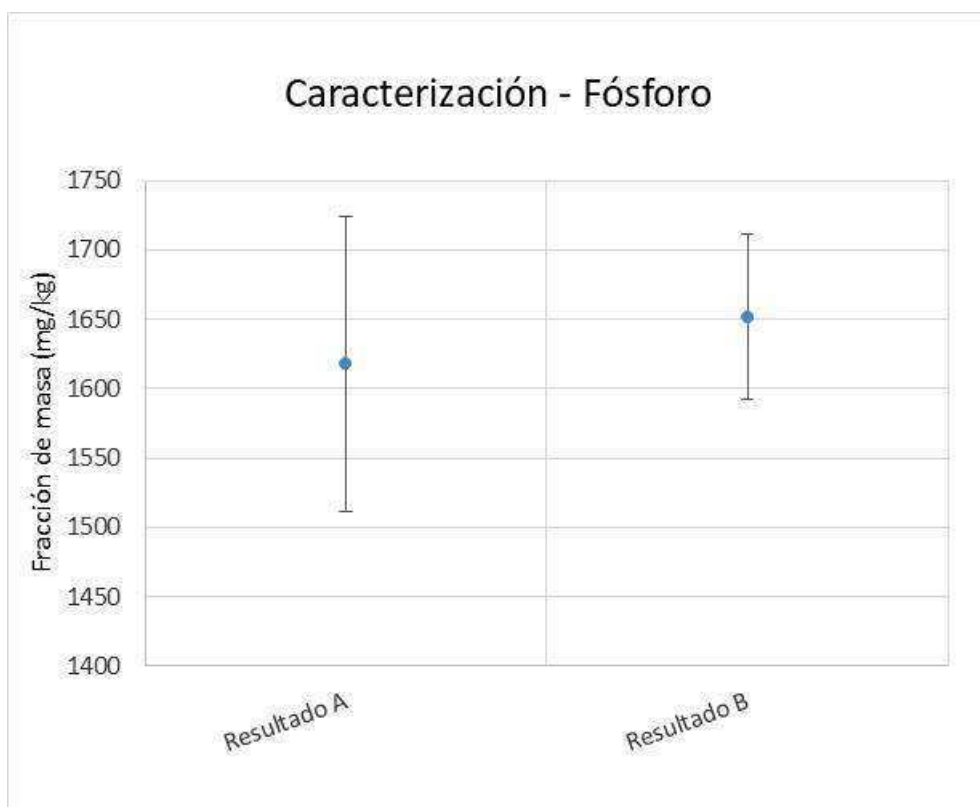


Figura 38 - Comparación de resultados para caracterización de P en el MRC

En la Tabla 28 se muestran los valores finales asignados al MRC y la incertidumbre asociada.

	Valor asignado* (mg/kg)	Incertidumbre (u) (mg/kg)
As	0,0568	0,0020
Cd	0,756	0,013
P	1635	32
Pb	0,436	0,012
Na	33,92	0,31

Tabla 28 - Valor de caracterización del MRC e incertidumbre asociada.

*Valores expresados en base seca

4.11 Estimación de la incertidumbre del MRC

La incertidumbre del MRC fue estimada de acuerdo con (ISO 33405 2024) a través de la siguiente ecuación:

$$u_{CRM} = \sqrt{u_{char} + u_{hom} + u_{sts} + u_{lts}} \quad Ec. 16$$

Donde:

- u_{CRM} denota la incertidumbre estándar asociada con el valor de la propiedad del MRC
- u_{char} denota la contribución combinada de la incertidumbre estándar proveniente de la caracterización del valor de la propiedad
- u_{hom} denota la contribución de la incertidumbre proveniente de la evaluación de la homogeneidad

- u_{sts} denota la contribución de la incertidumbre proveniente de la evaluación de la estabilidad en condiciones de transporte.
- u_{lts} denota la contribución de la incertidumbre proveniente de la evaluación de la estabilidad a largo plazo.

	u_{char} (mg/kg)	u_{hom} (mg/kg)	u_{sts} (mg/kg)	u_{lts} (mg/kg)	u_{CRM} (mg/kg)	$U_{k=2}$ (mg/kg)	U_{rel} (%)
As	0,0020	0,0012	0,00081	0,00055	0,0018	0,0037	6,5
Cd	0,013	0,0069	0,0035	0,0071	0,017	0,034	4,5
P	32	9,8	16	32	49	98	6,0
Pb	0,012	0,031	0,015	0,0096	0,038	0,076	17,5
Na	0,31	0,35	0,44	0,42	0,76	1,5	4,5

Tabla 29 - Presupuesto de incertidumbre final del MRC

Los resultados muestran que las incertidumbres relativas se encuentran dentro de rangos normalmente encontrados, para materiales de referencia de elementos, a estos niveles de fracción de masa y en una matriz natural, oscilando entre 4,5 % y 17,5 %, dependiendo del elemento evaluado.

En el caso de arsénico, la incertidumbre relativa fue de 6,5 %, con una contribución predominante de la etapa de caracterización. Para Cd y Na, las incertidumbres relativas más bajas (4,5 %) evidencian una excelente performance de los métodos de análisis empleados y una elevada homogeneidad del lote.

Por otro lado, el fósforo presenta una incertidumbre combinada más elevada en términos absolutos, atribuible a la magnitud de su concentración en la matriz y al efecto acumulativo de las contribuciones de homogeneidad y estabilidad. Sin embargo, su incertidumbre relativa (6,0 %) se mantiene dentro de los valores recomendados para materiales de referencia certificados de composición similar.

El Pb mostró la incertidumbre relativa más alta (17,5 %), derivada principalmente de la mayor variabilidad entre frascos observada en los estudios de homogeneidad y el uso de un único método para asignar el valor.

En conjunto, los valores obtenidos confirman que las incertidumbres asociadas a todos los elementos garantizan la idoneidad metrológica del MRC y su aptitud para ser utilizado como material de referencia certificado en la determinación de elementos traza en yerba mate y otras matrices vegetales afines.

4.12 Organización de un Ensayo de Aptitud

Con el propósito de evaluar la comparabilidad de resultados y la competencia técnica de los laboratorios que determinan elementos traza en yerba mate, se organizó un ensayo de aptitud empleando el MRC desarrollado.

El diseño del ensayo se ajustó a los lineamientos de la norma (UNIT-ISO/IEC 17043 2010), garantizando la confidencialidad de los resultados. Cada participante recibió una botella del MRC, junto con instrucciones generales para la manipulación y reporte de resultados. No se indicó un método específico de análisis, de modo que cada laboratorio pudiera aplicar sus procedimientos de rutina, reflejando así la variabilidad metodológica existente.

Para la evaluación estadística del desempeño, se utilizó el z' -score como criterio de comparación, que viene definido de acuerdo con la Ecuación 17:

$$z' - score = \frac{E}{\sqrt{\sigma_{EA}^2 + u_{MRC}^2}}$$

Definiendo E (error), como la diferencia entre el resultado reportado por el laboratorio y el valor asignado al MRC, σ_{EA} la desviación estándar del ensayo de aptitud y u_{MRC} como la incertidumbre del valor asignado al MRC. En este estudio, la desviación estándar para la evaluación del desempeño σ_{EA} se fijó en 7,5 %, valor considerado representativo de la variabilidad aceptable en la determinación de elementos traza en matrices vegetales.

Los resultados con $|z| \leq 2$ fueron clasificados como satisfactorios, los comprendidos entre $2 < |z| < 3$ como cuestionables y aquellos con $|z| \geq 3$ fueron considerados no conformes. Un resumen de la evaluación del desempeño de los laboratorios participantes se presenta en la Tabla 30.

	As	Cd	Na	P	Pb
Numero de laboratorios que informaron resultados	1	4	3	1	3
Porcentaje de resultados conformes	0 %	50 %	33,3 %	100 %	0 %
Porcentaje de resultados cuestionables	0 %	0 %	0 %	0 %	66,6 %
Porcentaje de resultados no conformes	100 %	50 %	66,6 %	0 %	33,3 %

Tabla 30 - Resumen de la evaluación del desempeño de los laboratorios participantes del Ensayo de Aptitud

Del total de resultados informados, aproximadamente el 50 % fueron clasificados como no conformes. Este comportamiento sugiere la presencia de errores sistemáticos en los procedimientos analíticos aplicados por los participantes. Lejos de considerarse una limitación, estos resultados, que probablemente correspondan a la primera experiencia de varios laboratorios frente a una evaluación externa de sus mediciones en esta matriz, ponen de manifiesto la necesidad y relevancia de contar MRC específico de yerba mate. MRC que permitirá implementar evaluaciones rutinarias de la calidad, mejorar el desempeño analítico y fortalecer la exactitud y comparabilidad de las mediciones de elementos en yerba mate.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

En la presente tesis se desarrolló exitosamente un MRC de As, Cd, P, Pb y Na en yerba mate, inexistente en el mercado sea nacional o internacional al momento de la finalización de esta tesis. Este logro constituye una contribución significativa para el aseguramiento de la calidad en el control de contaminantes y nutrientes en esta matriz de gran relevancia.

Su disponibilidad contribuirá al fortalecimiento de las capacidades analíticas de los laboratorios, promoviendo el uso de MRC, como la herramienta más robusta y confiable actualmente disponible para evaluar la exactitud de los métodos. De este modo, se favorecerá la comparabilidad de los resultados a nivel nacional e internacional, apoyando un comercio más equitativo y la protección de la inocuidad alimentaria.

El proceso de producción del material incluyó el estudio y la optimización de las etapas de molienda, homogenización y envasado, garantizando la obtención de un lote con adecuada homogeneidad y estabilidad bajo condiciones de almacenamiento y transporte; propiedades que fueron evaluadas mediante procedimientos estadísticos rigurosos.

Se desarrollaron y validaron métodos de alta exactitud para la cuantificación de Pb y Cd mediante dilución isotópica con detección ICP-SFMS, considerado método primario de acuerdo con los criterios del BIPM. Asimismo, se establecieron y validaron métodos robustos basados en el método de cuantificación por adición estándar gravimétrico en un punto para la determinación de As, Na y P empleando ICP-SFMS e ICP-AES, alcanzando límites de cuantificación adecuados para niveles traza y cumpliendo con criterios estrictos de precisión y exactitud analítica.

La organización de la Intercomparación SIM.QM-S11 permitió verificar externamente la exactitud de los métodos desarrollados y la comparabilidad de las mediciones a nivel internacional, además de sentar un precedente como primera comparación en química organizada a este nivel por Uruguay.

Se finalizó el proceso de certificación del material, estableciéndose los valores asignados certificados y sus incertidumbres asociadas. Las principales fuentes de incertidumbre fueron atribuidas a caracterización del valor asignado, seguidas por los componentes vinculados a la homogeneidad y la estabilidad.

Con el MRC producido se organizó una ronda de Ensayo de Aptitud, en la que diversos laboratorios de análisis pudieron evaluar su desempeño empleando sus metodologías de rutina, demostrando su competencia o identificando posibles sesgos en sus mediciones, con el fin de implementar acciones correctivas y mejorar su desempeño analítico.

Perspectivas

El desarrollo de este Material de Referencia Certificado constituye un punto de partida para nuevas líneas de investigación orientadas al fortalecimiento de la infraestructura metrológica en matrices alimentarias de origen vegetal. A partir de los resultados obtenidos, se propone extender la caracterización del material hacia otros elementos de interés toxicológico o nutricional, tales como Hg, Cr, Fe, K, Ca y Mg.

Adicionalmente se podría replicar el enfoque con otras matrices alimentarias, por ejemplo, té, cacao, café, hierbas medicinales o especias y avanzar hacia programas de producción sistemática de MRC, aumentando la disponibilidad de estos y disminuyendo el costo de acceso para los laboratorios nacionales y regionales.

CAPÍTULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre Marcelo, Marcelo Caetano, Camila Alves Martins, Dirce Pozebon, Valdeir L. Dressler, e Marcos Flores Ferrão. «Classification of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) according to the country of origin based on element concentrations.» *Microchemical Journal* 117 (2014): 164-171.
- Amaral, Clarice D.B., Renata S. Amais, Lucimar L. Fialho, Daniela Schiavo, Ana Rita A. Nogueira, e Joaquim A. Nóbrega . «Determination of carbon in digested samples and amino acids by inductively coupled plasma tandem mass spectrometry.» *Microchemical Journal* 122 (2015): 29-32.
- Anton Paar GmbH. *Microwave Reaction System for Sample Preparation Multiwave PRO. D19IP001EN-H*, 2019.
- AOAC. «Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.» *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 2016: 1-18.
- Benedé, Juan L., e Francisco Pena-Pereira. «On the greenness of recent microwave-assisted digestion methods: An evaluation with AGREeprep.» *Advances in Sample Preparation* 14, n. 100177 (2025).
- Bhandari, Sandeep A., e Dulsasiri Amarasiriwardena. «Closed-vessel microwave acid digestion of commercial maple syrup for the determination of lead and seven other trace elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry.» *Microchemical Journal* 64 (2000): 73-84.
- Boss, Charles B., e Kenneth J. Fredeen. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*. Shelton, CT, USA.: PerkinElmer, 2004.
- Camotti Bastos, Marília, Verediana Fernanda Cherobim, Carlos Bruno Reissmann, Jéssica Fernandes Kaseker, e Sérgio Gaiad. «Yerba mate: Nutrient levels and quality of the beverage depending on the harvest season.» *Journal of Food Composition and Analysis* 69 (2018): 1-6.
- Cantwell (ed), H. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 3. 2025.
- Carter, Jake A., Ariane I Barros, Joaquim A. Nóbrega, e George L. Donati. «Traditional Calibration Methods in Atomic Spectrometry and New Calibration Strategies for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.» *Frontiers in Chemistry* 6 (2018).

- Cerqueira da Silva, Vinnícius Henrique, et al. «Chemometric tools in the optimization of a microwave-assisted digestion procedure for guarana-based drink samples and data analysis from elemental, caffeine, and epicatechin contents.» *Food Chemistry* 365 (2021): 1-9.
- Costa, Letícia M., Sérgio L. C. Ferreira, Ana Rita A. Nogueira, e Joaquim A. Nóbrega. «Use of Factorial Design for Optimization of Microwave-Assisted Digestion of Lubricating Oil.» *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16, n. 6A (2005): 1269-1274.
- De Bièvre, Paul, René Dybkaer, Ales Fajgelj, e D. Bryan Hibbert. «Metrological traceability of measurement results in chemistry: Concepts and implementation.» *Pure and Applied Chemistry* 83, n. 10 (2011): 1873-1935.
- de Oliveira, Elisabeth. «Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends.» *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14, n. 2 (2003): 172-182.
- Donati, George L., e Renata S. Amais. «Fundamentals and new approaches to calibration in atomic spectrometry.» *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 34 (2019): 2353-2369.
- Finnigan MAT. *Software Element I*. Bremen, 1995.
- Folch, Christine. «Stimulating consumption: yerba mate myths, markets, and meanings from conquest to present.» *Comparative Studies in Society and History* 52, n. 1 (2010): 6-36.
- Giavarina, Davide. «Understanding Bland Altman analysis.» *Biochemia Medica* 25, n. 2 (2015): 141-151.
- Gobbo dos Santos, Lisia Maria, Santos Alves Vicentini Neto, Giovanna Iozzi, e Silvana do Couto Jacob. «Arsenic, cadmium and lead concentrations in Yerba mate commercialized in Southern Brazil by inductively coupled plasma mass spectrometry.» *Ciencia Rural* 47, n. 12 (2017).
- Gouveia, Sandro T., Fernando V. Silva, Letícia M. Costa, Ana Rita A. Nogueira, e Joaquim A. Nóbrega. «Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations.» *Analytica Chimica Acta* 445 (2001): 269-275.
- Grindlay, Guillermo, Juan Mora, Margaretha de Loos-Vollebregt, e Frank Vanhaecke. «A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-

- ionize elements in inductively coupled plasma - mass spectrometry.» *Spectrochimica Acta Part B* 86 (2013): 42-49.
- Hearn, Ruth, Peter Evans, e Mike Sargent. «Development of a high ratio isotope dilution mass spectrometry calibration technique for chemical metrology.» *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20 (2005): 1019-1023.
- Heck, C. I., e E. G. De Mejia. «Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations.» *Journal of Food Science* 72 (2007): 138-151.
- Heumann, Klaus G. «Isotope dilution mass spectrometry fot micro and trace element determination.» *Trends in Analytical Chemistry* 1, n. 15 (1982): 357-361.
- IRAM. «Yerba mate. Determinación de la pérdida de masa a 103 °C.» (Instituto Argentino de Normalizacion y Comercializacion) 2019.
- ISO 13528. «Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison.» *Interational Organization for Standarization*, 2022.
- ISO 17034. «General requirments for the competence of reference material producers.» *International Organization for Standarization*, 2016.
- ISO 33405. «Reference materials — Approaches for characterization and assessment of homogeneity and stability.» *International Organization for Standarization*, 2024.
- ISO 35. «Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.» *International Organization for Standarization*, 2017.
- ISO GUIDE 30. «Reference materials — Selected terms and definitions.» *International Organization for Standarization*, 2015.
- Jakubowski, Norbert, Luc Moens, e Frank Vanhaecke. «Sector field mass spectrometers in ICP-MS.» *Spectrochimica Acta Part B* 53 (1998): 1739-1763.
- JCGM 100. «Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement.» *Joint Committee for Guides in Metrology - Bureau International des Poids et Mesures*, 2008.
- JCGM 101. «Evaluation of measurement data—Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” - Propagation of distributions using a Monte Carlo method.» *Joint Committee for Guides in Metrology - Bureau International des Poids et Mesures*, 2008.

- JCGM 200:2012. «International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM).» *Joint Committee for Guides in Metrology*, s.d.
- JCGM 200:2012. «International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM).» *Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM)*, 2012.
- Johra, Hicham. «Simple uncertainty budget and assessment with the Kragten method: Examples for building physics.» *Department of the Built Environment, Aalborg University. DCE Lecture notes*, n. 85 (2024).
- Joint Committee for Guides in Metrology. «Evaluation of measurement data – The role of measurement uncertainty in conformity assessment JCGM:106:2012.» *Bureau International des Poids et Mesures*, 2012.
- Krushevska, Antoaneta, Ramon M. Barnes, Chitra J. Amarasiriwaradena, Henry Foner, e Laura Martines. «Determination of the Residual Carbon Content by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry After Decomposition of Biological Samples.» *Jorunal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1992: 845-850.
- Kujawska, Monika. «Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Beverage: Nutraceutical Ingredient or Conveyor for the intake of Medicinal Plants? Evidence from Paraguayan Folk Medicine.» *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018: 1-17.
- Lafarge, T., e A. Possolo. «The NIST Uncertainty Machine.» *NCSLI Measure Journal of Measurement Science* 10, n. 3 (2015): 20-27.
- Lee, Jian, Ye-Seul Park, e Do Yup Lee. «Fast and green microwave-assisted digestion with diluted nitric acid and hydrogen peroxide and subsequent determination of elemental composition in brown and white rice by ICP-MS and ICP-OES.» *LWT - Food Science and Technology* 173, n. 114351 (2023).
- Lenth, R. V. *Response-Surface Methods in R, Using rsm*. Vol. 32. 7 vol. *Journal of Statistical Software*, 2009.
- Machado, R. C., C. D. B. Amaral, D. Schiavo, J. A. Nóbrega, e A. R. A. Nogueira. «Complex samples and spectral interferences in ICP-MS: Evaluation of tandem mass spectrometry for interference-free determination of cadmium, tin and platinum group elements.» *Microchemical Journal* 130 (2017): 271–275.

- Magari, Ederlan, et al. «Cadmium and lead concentrations in yerba mate leaves from agroforestry and plantation systems: An international survey in South America.» *Journal of Food Composition and Analysis* 96 (2021): 1-11.
- Marques, Thiago L., Helmar Wiltsche, Joaquim A. Nóbrega, Monika Winkler, e Günter Knapp. «Performance evaluation of a high-pressure microwave-assisted low digestion system for juice and milk sample preparation.» *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (2017): 4449-4458.
- Martín, C.M., S. P. Molina, D. A. Sosa, G. Arndt, D. L. Brusilovsky, e M. E. Schmalko. «Pb, Cd y As en suelos y ramas de yerba mate de diferentes orígenes geográficos.» *Revista De Ciencia Y Tecnología* 40, n. 1 (2023): 66-77.
- Massart, D. L., B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, e J. Smeyers-Verbeke. «Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Vol. 20.» *Amsterdam, Elsevier Science*, 1997.
- May, T. W., e R. H. Wiedmeyer. «A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS.» *Atomic Spectroscopy* 19(5) (1998): 150-155.
- Mendoza, J. *Statista*. 12 mayo 2020. <https://www.statista.com/statistics/884925/consumption-yerba-mate-per-capita-latin-america/>.
- . *Statista*. julio 2025. <https://www.statista.com/statistics/994662/latin-america-leading-yerba-mate-exporting-countries/> (consultato il giorno mayo 12, 2020).
- Mesko, Marcia F., et al. «Ultraviolet radiation combined with microwave-assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS.» *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015): 260-266.
- Mester, Z., e R. Sturgeon. «Sample preparation for trace element analysis.» *Comprehensive Analytical chemistry Vol XLI*, 2003.
- Milton, M. J. T., e T.J. Quinn. «Primary methods for the measurement of amount of substance.» *Metrologia*, n. 38 (2001): 289-296.
- Nardi, Elene P., et al. «The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples.» *Food Chemistry* 112 (2009): 727-732.
- Ni, Zhanglin, Zhenchao Chen, Qing Yu, Xiaowei Sun, e Fubin Tang. «Microwave-assisted digestion for trace elements analysis of tree nut oil: evaluation of residual carbon content.» *Spectroscopy letters* 51, n. 10 (2018): 518-523.

- Nogueira, Raquel. «Metrological Traceability of Measurement Results in Pharmaceutical and Chemical Sciences: Selection and Use of Certified Reference Materials.» *Journal of the Brazilian Chemical Society* 26, n. 2 (2015): 209-217.
- Nordberg, Gunnar F., e Max Costa. *Handbook on the toxicology of metals*. Vol. Volumen I: General Considerations. 2022.
- Novaes, Cleber Galvão, Marcos Almeida Bezerra, Erik Galvão Paranhos da Silva, Ana Maria Pinto dos Santos, Ivana Lago da Silva Romão, e João Honorato Santos Neto. «A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES).» *Microchemical Journal* 128 (2016): 331-346.
- Nziguheba, Generose, e Erik Smolders. «Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European Countries.» *Science of the Total Environment* 390 (2008): 53-57.
- Olivares, I.R.B., G.B. Souza, A.R.A. Nogueira, G.T.K. Toledo, e D.C. Marcki. «Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis - Focus on food, water, soli and sediment matrices.» *Trends in Analytical Chemistry* 100 (2018): 53-64.
- Ouerdane, Laurent, Zoltán Mester, e Juris Mejia. «General equation for multiple spiking isotope dilution mass spectrometry.» *Analytical Chemistry* 81 (2009): 5075-5079.
- Panzl, María Victoria, et al. «Trace element and mercury speciation analysis in yerba mate (*Ilex paraguariensis*).» *Journal of Trace Elements and Minerals* 12, n. 100217 (2025): 1-13.
- Pardinho, Renan B., et al. «Determination of toxic elements in yerba mate by ICP-MS after diluted acid digestion under O₂ pressure.» *Food Chemistry* 263 (2018): 37-41.
- Pereira Schmite, Bruna de Fátima, Alessandra Bitobrovec, Ana Carolina Mendes Hacke, Romaiana Picada Pereira, Patrícia Los Weinert, e Vanessa Egéa dos Anjos. «In vitro bioaccessibility of Al, Cu, Cd, and Pb following simulated gastro- intestinal digestion and total content of these metals in different Brazilian brands of yerba mate tea.» *Food Chemistry* 281 (2019): 285-293.
- Pérez Zambra, Ramiro, et al. «SIM.QM-S11: Supplementary comparison for elements in Yerba mate (*Ilex paraguariensis*).» *Metrologia* 62 (2025).

- Possolo, A., A. Koepke, D. Newton, e M. Winchester. «Decision Tree for Key Comparisons.» *Journal of Research (NIST JRES) National Institute of Standards and Technology*, 2021.
- Prohaska, Thomas. *New development in Mass Spectrometry: Sector Field Mass Spectrometry for Elemental and Isotopic Analysis*. A cura di Thomas Prohaska, Johanna Irrgeher, Andreas Zitek e Nobert Jakubowski. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015.
- Recknagel, Sebastian, Harald Bresch, Heinrich Kipphardt, Matthias Koch, Martin Rosner, e Ute Resch-Genger. «Trends in selected fields of reference material production.» *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 414 (2022): 4281-4289.
- Riisom, Mie, Bente Gammelgaard, Ian H. Lambert, e Stefan Stürup. «Development and validation of an ICP-MS method for quantification of total carbon and platinum in cell samples and comparison of open-vessel and microwave-assisted acid digestion methods.» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 158 (2018): 144-150.
- Rugi, Francesco. «Sviluppo e ottimizzazione di metodi in ICP-SFMS e ICP-AES per la determinazione di metalli in matrici di interesse ambientale e biologico.» *Corso di Dottorato in Scienze Chimiche. Università degli studi di Firenze*, 2010.
- Salit, Marc L., e Gregory C. Turk. «A Drift Correction Procedure.» *Analytical Chemistry* 70 (1998): 3184-3190.
- Samoggia, Antonella, Pietro Landuzzi, e Carmen Enrqueta Vicién. «Market Expansion of Caffeine-Containing Products: Italian and Argentinian Yerba Mate Consumer Behavior and Health Perception.» *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, n. 8117 (2021): 1-27.
- Sánchez Rojas, F., C. Bosch Ojeda, e J. M. Cano Pavón. «Experimental design in the optimization of a microwave acid digestion procedure for the determination of metals in biomorphic ceramic samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic absorption spectrometry.» *Microchemical Journal* 94 (2010): 7-13.
- Skoog, Douglas A., F. James Holler, e Stanley R. Crouch. *Principles of Instrumental Analysis*. 7. Boston, MA: Cengage Learning, 2018.
- Smith, F. E., e E. A. Arsenault. «Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry.» *Talanta* 43, n. 8 (1996): 1207-1268.

- Sturup, S. «Development, optimisation, and application of ICP-SFMS methods for the measurement of isotope ratios.» *Rise National Laboratory*, 2000.
- Thermo Fisher Scientific. «Element2/ElementXR Hardware Manual.» *Revision C - 1191410*, 2009.
- Thomas, Robert. *Practical Guide to ICP-MS. A tutorial for beginners*. 3ra edición. CRC Press, 2013.
- UNIT-ISO/IEC 17043. *Evaluación de la conformidad — Requisitos generales para la competencia de los proveedores de ensayos de aptitud*. 2010.
- Valduga, Alice Teresa, Itamar Luís Gonçalves, e Ederlan Magri. «Analysis of the Presence of Toxic Metals in Yerba Mate Samples: a Case Study from South Brazil.» *Water Air and Soil Pollution* 230, n. 153 (2019): 1-8.
- Vogl, Jochen, e Wolfgang Pritzkow. «Isotope Dilution Mass Spectrometry - A Primary Method of Measurement and Its Role for RM Certification.» *MAPAN - Journal of Metrology Society of India* 25, n. 3 (2010): 135-164.
- Wasilewska, M., W. Goessler, M. Zischka, B. Maichin, e G. Knapp. «Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements.» *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002): 1121-1125.
- Watters, R. L., K. R. Eberhardt, E. S. Beary, e J. D. Fassett. «Protocol for isotope dilution using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of inorganic elements.» *Metrologia* 34 (1997): 87-96.
- Wong, Ming-Keong, Wei Gu, e Toon-Lee Ng. «Sample preparation using microwave assisted digestion or extraction techniques.» *Analytical Sciences*, 1997: 97-102.
- Yang, Lu, e Ralph E. Strugeon. «Comparison of mass bias correction models for the examination of isotopic composition of mercury using sector field ICP-MS.» *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003): 1452-1457.
- Zhu, Xiang-Kun, Jacqueline Benefield, Tyler B. Coplen, Zhaofu Gao, e Norman E. Holden. «Variation of lead isotopic composition and atomic weight in terrestrial materials (IUPAC Technical Report).» *Pure and Applied Chemistry* 93, n. 1 (2021): 155-166.
- Zhu, Yanbei, e Koichi Chiba. «Internal standard method coupled with a gravimetric standard addition method for elemental measurements by ICP-MS.» *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27, n. 100 (2012): 1000-1006.

CAPÍTULO VII ANEXOS

7.1 Trabajos presentados en eventos científicos

- Desarrollo de un método de dilución isotópica para la determinación de cadmio y plomo en *Ilex paraguariensis* (Yerba mate). Pérez Zambra, Ramiro; Napoli, Romina; Ferreira, Elizabeth; Sixto, Alexandra; Pistón Mariela. Séptimo congreso uruguayo de Química Analítica, Montevideo 26 al 28 de octubre de 2022. Presentado en modalidad de póster.
- Avances en el desarrollo de un Material de Referencia Certificado de As, Cd, Pb, Na y P en *Ilex paraguariensis* (Yerba mate). Pérez Zambra, Ramiro; Napoli, Romina; Ferreira, Elizabeth; Sixto, Alexandra; Pistón Mariela. Séptimo congreso uruguayo de Química Analítica, Montevideo 26 al 28 de octubre de 2022. Presentado en modalidad de póster.



P OTR08

Desarrollo de un método de dilución isotópica con detección por ICP-MS para la determinación de cadmio y plomo en *Ilex paraguariensis* (Yerba mate).

Pérez Zambra, Ramiro^{1,2}; Napoli, Romina¹; Ferreira, Elizabeth¹; Sixto, Alexandra²; Pistón Mariela².

¹Departamento de Metrología Química, Gerencia de Análisis, Ensayos y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Montevideo-Uruguay

²Grupo de Análisis de Elementos trazas y desarrollo de estrategias simples para preparación de muestras (GATPREM), DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay

³Programa de posgrado, Facultad de Química, Universidad de la República

rperez@latu.org.uy

El mate, infusión de *Ilex paraguariensis*, forma parte del acervo cultural del Uruguay dado que al aspecto gastronómico se le suma el social; haciéndolo un producto de gran consumo, también popular en Argentina, Paraguay y sur de Brasil entre otros. En un producto de consumo masivo, asegurar la inocuidad alimentaria es de vital importancia.

La presencia de concentraciones de cadmio y plomo en lotes de yerba mate importados a Uruguay generó alerta de las autoridades sanitarias, tomándose acciones al respecto.

Esto evidencia que las mediciones son la principal fuente de información para la toma de decisiones en el momento de aceptar o rechazar un lote producido. Es en esos momentos que la Química Analítica cobra especial relevancia brindando soluciones para aportar certezas.

Se presenta el desarrollo de un método de alta exactitud basado en dilución isotópica en dos etapas con detección por ICP-MS para la determinación de cadmio y plomo en yerba mate, como aporte al aseguramiento de la calidad de las mediciones en estas matrices.

El principio del método se basa en la medición de las relaciones isotópicas de un elemento en la muestra y en un calibrante a los cuales se les ha adicionado una masa conocida de disolución spike. La disolución spike contiene al elemento en estudio en una composición isotópica diferente a la muestra y al calibrante, generalmente se encuentra enriquecida en el isótopo de menor abundancia natural.

Para el tratamiento de muestra se estudió la utilización de distintas mezclas de reactivos que incluyeron HNO₃ y HF, agua ultrapura, H₂O₂, así como también programas de digestión que varían en la potencia irradiada a la muestra. Como resultado se obtuvo que la mejor mezcla para una toma de 0,5 g de muestra es 5,0 ml HNO₃, 4,0 ml H₂O, 2,0 ml H₂O₂ y 0,5 ml HF.

Basándose en el conocimiento previo de las posibles interferencias isobáricas tanto poliatómicas como doble-cargadas se seleccionaron los pares isotópicos. Se estudió el impacto de las



interferencias en las señales de cadmio, producidas tanto por el molibdeno como por el estaño presentes en la muestra y en reactivos.

Se seleccionó la secuencia de medición más adecuada con el propósito de disminuir el efecto de *mass discrimination* que se produce en el espectrómetro de masas.

Se validó la metodología utilizando materiales de referencia certificados de matrices similares a la estudiada. La exactitud del método fue probada utilizando el material de referencia certificado NIST 1547 *Peach leaves*, y una muestra obtenida en una comparación internacional CCQM-K89. Las recuperaciones obtenidas de estos materiales estuvieron en el rango de 95-98% con una incertidumbre menor al 5% en todos los casos.

El método desarrollado se considera que es adecuado al propósito para ser utilizado como método de referencia primario, de la más alta jerarquía metrológica, para la cuantificación inequívoca de cadmio y plomo en yerba mate. Este método podrá a su vez ser aplicado en la producción de materiales de referencia certificados inexistentes hasta el momento o en caso de arbitraje entre partes.

Agradecimientos: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Desarrollo de un método de dilución isotópica con detección por ICP-MS para la determinación de cadmio y plomo en *Ilex paraguariensis* (Yerba mate)



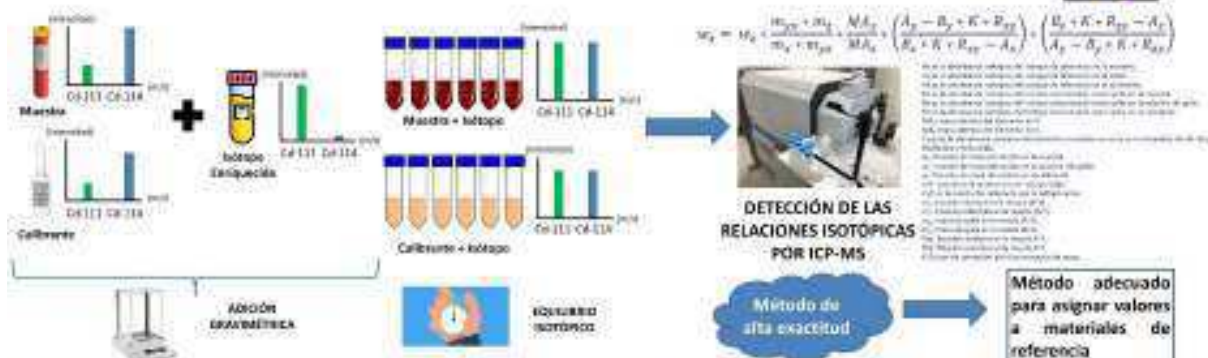
PÉREZ ZAMBRA, Ramiro ^{1,2}; NAPOLI, Romina ¹; FERREIRA, Elizabeth ¹; SIXTO, Alexandra ²; PISTÓN Mariela ².

¹ Departamento de Metrología Química, Dirección de Análisis, Ensayos y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Montevideo Uruguay

² Grupo de Análisis de Elementos Trazo y desarrollo de estrategias analíticas para preparación de muestras (GATPREM-DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay)

³ Programa de posgrado, Facultad de Química, Universidad de la República

Dilución isotópica (DI) en dos etapas con igualación de las relaciones (exact-matching)



Factores considerados en el desarrollo



Resultados

CADMIO	NIST SRM 1547 Peach leaves n = 0,0281 µg/g	NIST SRM 1574 Green Tea n = 0,027 µg/g	Muestra yerba mate n = 0,7 µg/g	Muestra CQM-439 Herba exalta n = 4,32 µg/g
Precisión (n=7)	3,7 %	3,3 %	3,0 %	0,13 %
Precisión (n=1)	3,7 %	—	3,1 %	—
Veracidad (Recuperación)	60 %	66 %	—	—
Intensidad de señal	2 %	5 %	4 %	2 %

PLOMO	NIST SRM 1547 Peach leaves n = 0,027 µg/g	Muestra yerba mate n = 0,4 µg/g	Muestra CQM-439 Herba exalta n = 8,33 µg/g
Precisión (n=7)	0,6 %	7,3 %	0,12 %
Precisión (n=1)	0,6 %	7,4 %	—
Veracidad (Recuperación)	97 %	—	—
Intensidad de señal	5 %	8 %	2 %

Método

- Se pesan en balanza analítica (0,1 mg de precisión) 0,1 g de muestra en un vaso de digestión. Se añaden 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) y 10 mL de ácido perclórico (HClO₄) en función de la masa y de la concentración del material de referencia (CQM-439) de control para obtener una relación isotópica (CQM-439).
- Se agita todo contenido de vaso de digestión 3-4 h de 1000 rpm en un baño de agua a 70 °C. Se añaden 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) y 10 mL de ácido perclórico (HClO₄) en función de la masa y de la concentración del material de referencia (CQM-439) de control para obtener una relación isotópica (CQM-439).
- Se transfiere todo contenido de vaso de digestión a un vaso de dilución de 100 mL. Se añaden 10 mL de agua destilada y 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) y 10 mL de ácido perclórico (HClO₄) en función de la masa y de la concentración del material de referencia (CQM-439) de control para obtener una relación isotópica (CQM-439).
- Se agita todo contenido de vaso de dilución 3-4 h de 1000 rpm en un baño de agua a 70 °C. Se añaden 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) y 10 mL de ácido perclórico (HClO₄) en función de la masa y de la concentración del material de referencia (CQM-439) de control para obtener una relación isotópica (CQM-439).
- Se pesan una alícuota para determinar el factor de masa de muestra (CQM-439) y se pesa una alícuota de muestra (CQM-439) de control para obtener una relación isotópica (CQM-439).
- Se pesan una alícuota para determinar el factor de masa de muestra (CQM-439) y se pesa una alícuota de muestra (CQM-439) de control para obtener una relación isotópica (CQM-439).
- Se realizan las mediciones en un ICP-MS. Se mide el factor de masa de muestra (CQM-439) y se mide el factor de muestra (CQM-439) de control para obtener una relación isotópica (CQM-439).

Conclusiones

El método desarrollado se considera que es adecuado al propósito para ser utilizado como método de referencia primario, de la más alta jerarquía metroológica, para la cuantificación inequívoca de cadmio y plomo en yerba mate. Este método podrá a su vez ser aplicado en la producción de materiales de referencia certificados inexistentes hasta el momento o en caso de arbitraje entre partes.



P OTR07

Avances en el desarrollo de un Material de Referencia Certificado de As, Cd, Pb, Na y P en *Ilex paraguariensis* (Yerba mate)

Pérez Zambra, Ramiro^{1,2}; Napoli, Romina¹; Ferreira, Elizabeth¹; Sixto, Alexandra²; Pistón Mariela².

¹Departamento de Metrología Química, Gerencia de Análisis, Ensayos y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Montevideo-Uruguay

²Grupo de Análisis de Elementos trazas y desarrollo de estrategias simples para preparación de muestras (GATPREM), DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay.

³Programa de posgrado, Facultad de Química, Universidad de la República
rperez@latu.org.uy

La determinación de elementos traza en yerba mate conlleva múltiples desafíos analíticos, por ser una matriz de alta complejidad. A los bajos niveles de cuantificación de contaminantes inorgánicos requeridos por la reglamentación existente, se le suma la fuerte presencia de interferencias tanto aditivas como multiplicativas en las técnicas de medición normalmente utilizadas, que se basan en Espectrometría Atómica.

En este contexto, un Material de Referencia Certificado (MRC) de la propia matriz es sin duda la mejor herramienta para garantizar la confiabilidad de los resultados emitidos por los laboratorios, dado que con el mismo se puede evaluar el proceso analítico en su conjunto.

Un MRC es un material cuyas propiedades han sido caracterizadas mediante procedimientos adecuados, acompañado de un certificado en el cual se indica el valor de la propiedad, la incertidumbre asociada y la declaración de la trazabilidad metroológica. El mismo debe cumplir con una serie de propiedades como son la homogeneidad, la estabilidad en el tiempo y la estabilidad en condiciones de transporte.

Este trabajo presenta los avances en el desarrollo de un MRC de yerba mate que permitirá a los laboratorios nacionales e internacionales contar con una herramienta de control de calidad de forma de garantizar la exactitud de sus resultados.

En base a determinaciones previas de los elementos de interés en diferentes lotes de yerba, se seleccionó un lote que contenía cantidades cuantificables de los analitos As, Cd, Pb, Na y P.

Por tratarse de una muestra compuesta de palo y hoja se debió moler el producto original de forma de obtener un material con un grado de homogeneidad adecuado. Luego de analizar dentro de las opciones de molienda disponibles, la estrategia seleccionada fue una molienda en dos etapas. Primeramente, en un Molino de cuchillas y posteriormente en un molino centrífugo con tamaño de malla de 0,08 mm. Se optimizaron las condiciones de molienda en el molino centrífugo de forma de no afectar el producto, variando la velocidad, caudal de carga y tiempo de encendido.



La homogenización fue realizada en una mezcladora tipo pantalón. Se estudió el tiempo de agitación, extrayendo fracciones de muestra cada 4 horas y analizándolas para monitorear la homogeneidad. Posterior al embotellado el producto fue analizado microbiológicamente y fue irradiado de forma de prolongar su vida útil.

Se desarrollaron métodos de medición de alta exactitud por ICP-SFMS y ICP-OES para la asignación de valor de referencia y realizar los estudios de homogeneidad, estabilidad acelerada y estabilidad a largo plazo pertinentes.

El material desarrollado, candidato a MRC, está siendo utilizado para un ensayo de aptitud a nivel regional y para una comparación internacional en el marco de las actividades del LATU como Instituto Nacional de Metrología.

Los resultados obtenidos hasta el momento auguran la consolidación de un MRC inexistente hasta el momento de varios elementos en yerba mate que estará disponible para su utilización a nivel internacional.

Agradecimientos: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Avances en el desarrollo de un Material de Referencia Certificado de As, Cd, Pb, Na y P en *Ilex paraguariensis* (Yerba mate)



PÉREZ ZAMBRA, Ramiro ^{1,2}; NAPOLI, Romina ¹; FERREIRA, Elizabeth ¹; SIXTO, Alexandra ²; PISTÓN Mariela ³

¹ Departamento de Metrología Química, Dirección de Análisis, Ensayos y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Montevideo Uruguay

² Grupo de Análisis de Elementos Traza y desarrollo de metodologías simples para preparación de muestras (GATFREM), SEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo Uruguay

³ Programa de posgrado, Facultad de Química, Universidad de la República

Introducción

La determinación de elementos traza en yerba mate conlleva múltiples desafíos analíticos, por ser una matriz de alta complejidad. A los bajos niveles de cuantificación de contaminantes inorgánicos requeridos por la reglamentación existente, se le suma la fuerte presencia de interferencias tanto aditivas como multiplicativas en las técnicas de medición normalmente utilizadas, que se basan en Espectrometría Atómica. En este contexto, un Material de Referencia Certificado (MRC) de la propia matriz es sin duda la mejor herramienta para garantizar la confiabilidad de los resultados emitidos por los laboratorios, dado que con el mismo se puede evaluar la exactitud del proceso analítico en su conjunto.

Propiedades del MRC a desarrollar

- Material con suficiente grado de homogeneidad
- Caracterización y asignación de valores a través de procedimientos analíticos de alta exactitud con trazabilidad metrológica
- Evaluación de la estabilidad en condiciones de transporte y en condiciones de almacenamiento



La Yerba mate consumida en Uruguay es una mezcla de hojas y tallos de la planta. Cada parte de la planta tiene una distribución distinta de los elementos de interés.

¿Cómo obtener un material homogéneo?

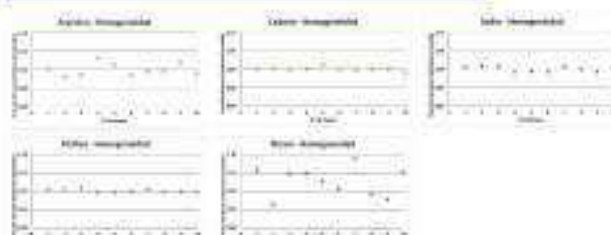
Optimizar proceso de molienda
Optimizar proceso de mezclado

Factores a tener en cuenta: disponibilidad del equipamiento, no contaminación del material y tamaño de partícula final.

Proceso de preparación del candidato a MRC desarrollado



Resultados estudio de homogeneidad



Análisis de datos de acuerdo a ISO GUIDE 35:2017 ANOVA, nivel de significancia: 0,05

Elemento	t	F _{crítico}	¿Homogéneo?	% _{hom}	¿Adecuado al uso?
As	2,20	2,39	SI	2,3%	SI
Cd	0,96	2,39	SI	0,9%	SI
Na	1,67	2,39	SI	1,0%	SI
P	1,75	2,39	SI	0,6%	SI
Pb	1,04	2,39	SI	8,5%	SI

Conclusiones y Perspectivas

- La metodología de molienda y mezclado optimizada permitió desarrollar un material con el suficiente grado de homogeneidad para hacer de este material un candidato a MRC.
- Con el candidato a MRC homogéneo se procederá a realizar los estudios de estabilidad de corta y larga duración así como la asignación del valor de las fracciones de masa a certificar.

7.2 Trabajos publicados en revistas científicas

Pérez Zambra R, Napoli R, Colombo G, Geisenblosen MC, Ferreira E, Puelles M, Acosta O, Lozano H, Cacioano de Sena R, Dominguez de Almeida M, Silva Dutra E, Sandoval Riquelme S, Vera Maldonado J, Núñez Cepeda C, Garzón Z DA, España S CA, Niño Q F, Carnedas V, Ortiz Apuy E, Venegas Padilla J, Meneses Sánchez J, Calderón Jiménez B, Kakoulides E, Schoina V, Stathoudaki E, Alexopoulos C, Arvizu Torres MR, Segoviano Regalado F, Ramirez Cruz P, Santiago Castellanos I, Carrasco Solis E, Uribe C, Sobina E, Sobina A, Tabatchikova T, Shin R, Dewi F, Sim Lay Peng, Jaćimović R, Zuliani T, Jagodic Hudobivnik M, Mazej D, Linsky M, Phukphatthanachai P, Thiengmanee U, Taebunpakul S. SIM.QM-S11: Supplementary comparison for elements in Yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Metrologia. 2025; 62(1A):08023. doi:10.1088/0026-1394/62/1A/08023.



LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY

SIM.QM-S11

**Supplementary Comparison for elements in
Yerba mate (*Ilex paraguariensis*)**

Final Report

Authors:

Ramiro Pérez Zambra, Romina Napoli, Gimena Colombo, Cecilia Geisenblosen, Elizabeth Ferreira.

Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), ⁽¹⁾
Uruguay.

Mabel Puelles, Osvaldo Acosta, Hernan Lozano.
Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).
Argentina.

Rodrigo Cacicano de Sena, Marcelo Dominguez de Almeida, Emily Silva Dutra.
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).
Brazil.

Soraya Sandoval Riquelme, Javier Vera Maldonado, Claudia Núñez Cepeda.
Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).
Chile.

Diego A. Garzón Z., Carlos A. España S., Fabian Niño Q., Vanessa Carnedas.
Instituto Nacional de Metrología de Colombia (INM).
Colombia.

⁽¹⁾ Coordinating Laboratory

Eric Ortiz Apuy, Jimmy Venegas Padilla, Jennifer Meneses Sánchez, Bryan Calderón Jiménez.
Laboratorio Costarricense de Metrología (LACOMET)
Costa Rica.

Elias Kakoulides, V. Scholna, E. Stathoudaki, C. Alexopoulos.
National Laboratory of Chemical Metrology / General Chemical State Laboratory – Hellenic
Institute of Metrology (EXHM).
Greece.

Maria del Rocio Arvizu Torres, Francisco Segoviano Regalado, Pedro Ramirez Cruz, Itzel Santiago
Castellanos.
Centro Nacional de Metrología (CENAM).
Mexico.

Elmer Carrasco Solis, Christian Uribe.
National Quality Institute (INACAL).
Peru.

Egor Sobina, Alena Sobina, Tatyana Tabatchikova.
Ural Research Institute for Metrology - Affiliated branch of the D.I. Mendeleyev Institute for
Metrology (VNIIM-UNIIM).
Russia.

Richard Shin, Fransiska Dewi, Sim Lay Peng.
Health Sciences Authority (HSA).
Singapore.

Radojko Jačimović, Tea Zuliani, Marta Jagodic Hudobivnik, Darja Mazej.
Jožef Stefan Institute (JSI).
Slovenia.

Maré Linsky.
National Metrology Institute of South Africa (NMISA).
South Africa.

Pranee Phukphatthanachai, Usana Thiengmanee, Sutthinun Taebunpakul.
National Institute of Metrology Thailand (NIMT).
Thailand.

SUMMARY

Yerba mate is a native plant found in subtropical South American regions (Paraguay, Brazil, Argentina, and Uruguay), where is commonly consumed as an infusion and worldwide as tea. The safety of yerba mate involves continuous monitoring of arsenic and cadmium levels, and the product's labeling also includes measurement of nutrient content such as sodium and phosphorus.

The Supplementary Comparison and parallel Pilot Study SIM.QM-S11 & P25 Elements in Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) covered arsenic (0.0575 mg/kg), cadmium (0.7526 mg/kg), sodium (33.46 mg/kg) and phosphorus (1.738 mg/g). The last CCQM or RMO key comparison / supplementary comparison of elements in plants matrices was organized by the Government Laboratory, Hong Kong, China (GLHK) in 2011 and results were published in 2013 (CCQM-K89 Trace and essential elements in *Herba Ecliptae*, including arsenic, calcium, cadmium, lead and zinc). Hence, it was timely to organize another comparison that could cover different measurands in high silica content matrix. Moreover, it enabled National Metrology Institutes / Designated Institutes (NMIs/DIs) that did not participate in previous comparisons to demonstrate their measurement competencies. Evidence of successful participation in formal, relevant international comparisons is needed to document calibration and measurement capability claims (CMCs) made by national metrology institutes (NMIs) and designated institutes (DIs).

Fifteen National Metrology Institutes and Designated Institutes participated in the Supplementary Comparison SIM.QM-S11 (Elements in Yerba mate (*Ilex paraguariensis*)).

Participants were asked to assess the mass fractions of arsenic, cadmium, and sodium in mg/kg, along with the mass fraction of phosphorus in mg/g on a dry mass basis in yerba mate matrix.

Results of all participating NMIs/DIs were evaluated against the supplementary comparison reference value (SCRV). The SCRv and associated uncertainty were determined from results of NMIs/DIs that participated in the supplementary comparison using methods with demonstrated metrological traceability. Most participating NMIs/DIs employed microwave-assisted acid digestion for sample preparation. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), sector field ICP-MS (SF-ICP-MS) and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES) were the most commonly used instrumental techniques.

Successful participation in SIM.QM-S11 demonstrates measurement capabilities in determining mass fraction of transition elements (except Hg), alkali and alkaline earth, non-metals (exp: C, N, and O) and metalloids/ semi-metals in mass fraction range from 0.02 mg/kg to 5000 mg/kg in high silica content matrixes.

TABLE OF CONTENTS

SUMMARY	3
INTRODUCTION	6
TIMELINE	7
MEASURANDS	7
STUDY MATERIALS	8
PARTICIPANTS AND INSTRUCTIONS	13
RESULTS	15
DETERMINATION OF SUPPLEMENTARY COMPARISON REFERENCE VALUE (SCRV)	
DEGREES OF EQUIVALENCE (DoE)	25
USE OF SIM.QM-S11 IN SUPPORT OF CALIBRATION AND MEASUREMENT CAPABILITY	
(CMC) CLAIMS	34
CONCLUSIONS	36
REFERENCES	37

LIST OF TABLES

Table 1. Timeline for SIM.QM-S11	7
Table 2. Measurands and expected mass fraction	7
Table 3. Homogeneity F-Test results	9
Table 4. Homogeneity ANOVA results	9
Table 5. Results of short-term stability assessment (at 40 °C for 3 weeks)	11
Table 6. Results of long-term stability assessment	12
Table 7. Institutes registered for SIM.QM-S11	13
Table 8. Summary of measurement methods and reference materials (for calibration) used	15
Table 9. Dry mass correction factor calculated by each institute	19
Table 10. Reported results for arsenic	20
Table 11. Reported results for cadmium	21
Table 12. Reported results for sodium	22
Table 13. Reported results for phosphorus	23
Table 14. Decision tree hypothesis test result for arsenic	26
Table 15. Degrees of equivalence for arsenic	27
Table 16. Decision tree hypothesis test result for cadmium	28
Table 17. Degrees of equivalence for cadmium	29
Table 18. Decision tree hypothesis test result for sodium	30
Table 19. Degrees of equivalence for sodium	31
Table 20. Decision tree hypothesis test result for phosphorus	32
Table 21. Degrees of equivalence for phosphorus	33
Table 22. Core Capability table	34

LIST OF FIGURES

Figure 1. Homogeneity – Arsenic results per bottle	9
Figure 2. Homogeneity – Cadmium results per bottle	10
Figure 3. Homogeneity – Sodium results per bottle	10
Figure 4. Homogeneity – Phosphorus results per bottle	10
Figure 5. Short-term stabilities of the measurands at 40 °C for 3 weeks	11
Figure 6. Results of Long-term stability assessment	12
Figure 7. Reported results for arsenic (mg/kg)	20

Figure 8. Reported results for cadmium (mg/kg).....	21
Figure 9. Reported results for sodium (mg/kg).....	22
Figure 10. Reported results for phosphorus (mg/g).....	23
Figure 11. SCRv estimation for arsenic using Hierarchical Skew Student-Gauss model.....	26
Figure 12. Degrees of equivalence of arsenic.....	27
Figure 13. SCRv estimation for cadmium using Adaptive Weighted Average model.....	28
Figure 14. Degrees of equivalence of cadmium.....	29
Figure 15. SCRv estimation for sodium using Hierarchical Laplace-Gauss model.....	30
Figure 16. Degrees of equivalence of sodium.....	31
Figure 17. SCRv estimation for phosphorus using Hierarchical Gauss-Gauss model.....	32
Figure 18. Degrees of equivalence of phosphorus.....	33

LIST OF APPENDICES

Appendix A: Study protocol.....	38
Appendix B: Registration Form	48
Appendix C: Reporting Form.....	50
Appendix D: NIST decision tree report	
D1 – Arsenic	53
D2 – Cadmium	57
D3 – Sodium	61
D4 – Phosphorus	65

INTRODUCTION

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*, Aquilifoliaceae) is a native plant which grows in the subtropical regions of South America: Paraguay, Brazil, Argentina and Uruguay. It is consumed as an infusion called "mate" in the beforementioned countries as well as all around the world as tea.

Due to safety reasons the mass fraction of arsenic and cadmium is constantly monitored in vegetal materials. Additionally, for the labeling purposes, the mass fraction of nutrients as sodium and phosphorus is also measured. Therefore, it is crucial that countries can develop measurement capabilities for these determinations in order to provide reference materials and measurement services, such as proficiency testing schemes. Evidence of successful participation in formal, relevant international comparisons is needed to document calibration and measurement capability claims (CMCs) made by national metrology institutes (NMIs) and designated institutes (DIs).

At the SIM CMWG meeting in November 2019, the SIM.QM-S11 "Supplementary Comparison for elements in Yerba mate" was proposed. In March 2021, SIM authorized the Supplementary Comparison SIM.QM-S11 "Supplementary Comparison for elements in Yerba mate (*Ilex paraguariensis*)".

The aim of this comparison is to enable NMIs/DIs to demonstrate their competence in the determination of elements at low and high levels in a vegetal material within the high silica content category.

The following sections of this report document the timeline of SIM.QM-S11, the measurands, study material, participants, results, and the measurement capability claims that participation in SIM.QM-S11 can support.

TIMELINE

Table 1 lists the timeline for SIM.QM-S11.

Table 1. Timeline for SIM.QM-S11

Date	Action
November 2019	Proposed to SIM CMWG
March 2021	SIM authorized SIM.QM-S11
April 2021	Call for participation
June 2021 – November 2021	Study samples shipped to participants. The range in shipping times reflects delays from shipping and customs.
February 2022	Deadline for submission of results
June 2024	Draft A report
March 2025	Draft A2 report
May 2025	Draft B report
TBD	Final report

MEASURANDS

The measurands and expected mass fraction (on a dry mass basis) are presented in Table 2.

Table 2. Measurands and expected mass fraction.

Measurand	Expected mass fraction (mg/kg)
Arsenic	0.02 – 1
Cadmium	0.1 – 5
Phosphorus	500 – 5000
Sodium	1 – 100

STUDY MATERIALS

Preparation

Several packs of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) from a batch suspected of contamination were selected. Determinations were performed, confirming that the sample contained quantifiable mass fractions of arsenic and cadmium. The sample was dried in a convection oven at 100 °C for 4 hours. After that, it was firstly grounded using a knife mill. Then, further grounding was done using an ultra-centrifugal mill (resulting in a particle size of approximately 80 µm). Finally, the material was thoroughly mixed using a V-shape mixer. The obtained powder was fractionated into pre-cleaned glass amber bottles containing approximately 25 g of material. A preliminary microbiological study showed undetectable levels (< 10 CFU/g) of aerobic mesophilic bacteria as well as yeast and mold. Nevertheless, the material was γ-irradiated with a dose of 23 kGy to ensure sterilization.

Recommended minimum sample amount

The recommended minimum sample amount for analysis was at least 0.5 g.

Dry mass determination

The determination dry mass correction had to be carried out on a minimum of three separate portions, each weighing 1 g. Samples had to be dried in an air-forced oven at 103 °C ± 2 °C for 2 hours. After cooling and weighting, the samples had to be reintroduced into the oven for an additional hour, repeating this step until a constant mass was reached. Constant mass was considered achieved when the difference between weights was less than 0.002 g. In general, constant mass should have been attained in the first 3 hours.

Homogeneity Assessment of Study Material

The homogeneity study was carried out according to ISO GUIDE 35:2017, using one-way ANOVA at 95 % level of confidence. Ten bottles were selected: the first one, the last one and the rest by stratified random sampling.

Determination of Cd was performed by ID-ICP-SFMS, As by SA-ICP-SFMS and Na and P by SA-ICP-OES in three subsamples per bottle. The study material was found to be sufficiently homogeneous. The results of *F*-Test are shown in Table 3.

Table 3. Homogeneity F-Test Results

Element	F	F-critical
Arsenic	2.20	2.39
Cadmium	0.96	2.39
Sodium	1.67	2.39
Phosphorus	1.75	2.39

Results of the homogeneity assessment are presented in Table 4.

Table 4. Homogeneity ANOVA Results

ANOVA Estimate	Arsenic	Cadmium	Sodium	Phosphorus
Within-packet, CV_{wth} :	2.0 %	0.90 %	0.93 %	0.54 %
Between-packet, CV_{btw} :	2.9 %	0.88 %	1.20 %	0.72 %
Total analytical variability, CV:	2.3 %	0.89 %	1.03 %	0.60 %

The results for the homogeneity study are graphically represented in Figure 1 to 4.

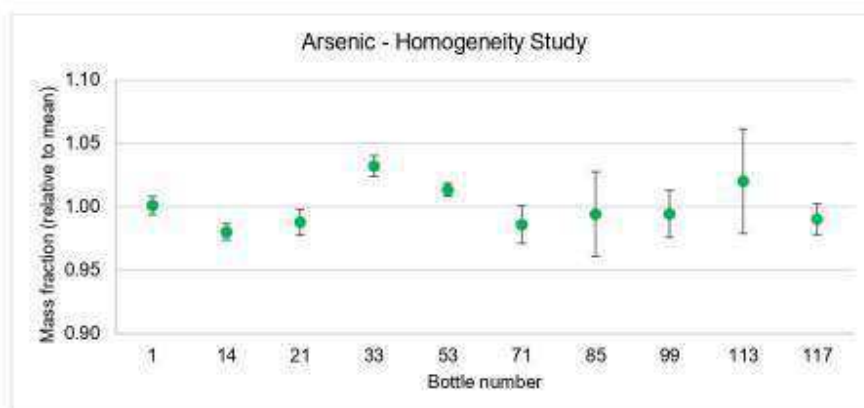


Figure 1. Homogeneity - Arsenic results per bottle.
Error bars represent standard uncertainties between subsamples.

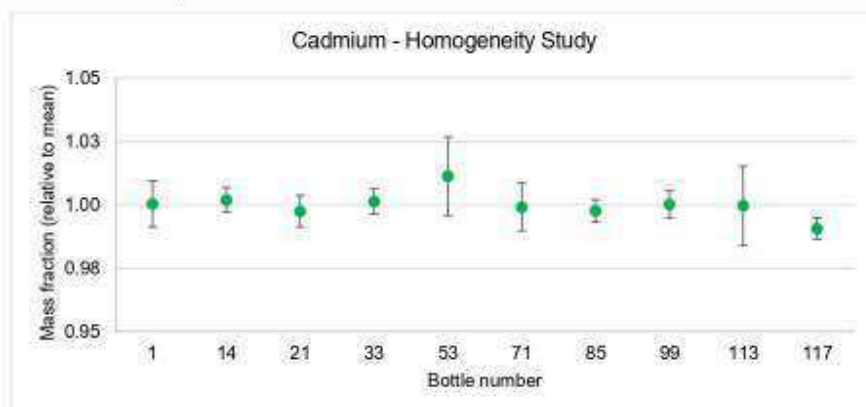


Figure 2. Homogeneity - Cadmium results per bottle.
Error bars represent standard uncertainties between subsamples.

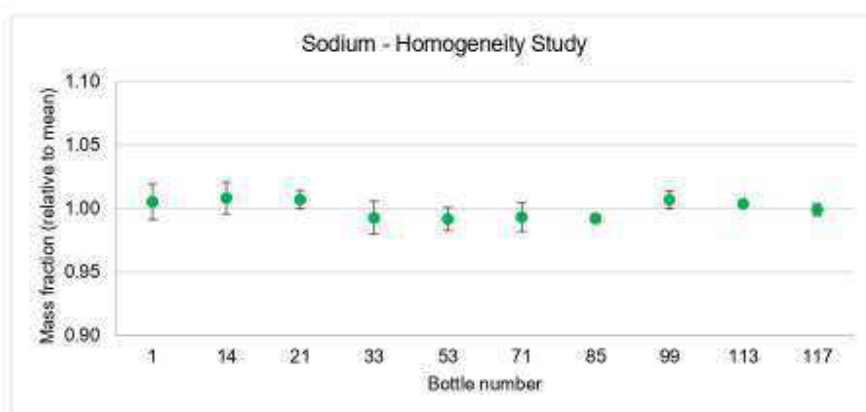


Figure 3. Homogeneity - Sodium results per bottle.
Error bars represent standard uncertainties between subsamples.

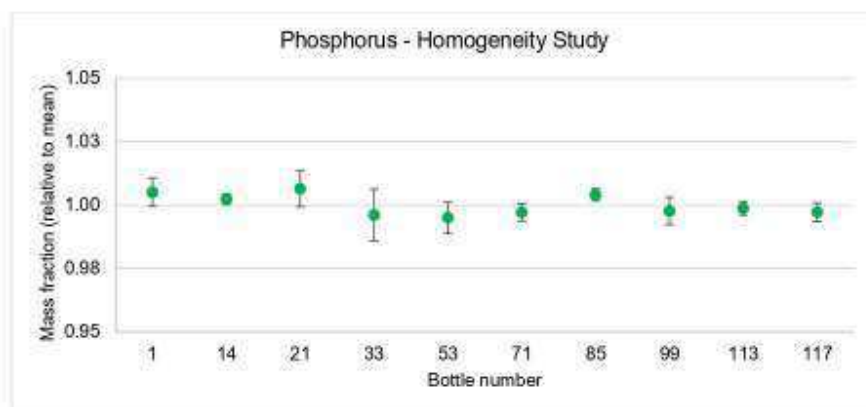


Figure 4. Homogeneity - Phosphorus results per bottle.
Error bars represent standard uncertainties between subsamples.

Stability Assessment of Study Material

Short-term stability

To evaluate a possible sample's instability during transportation due to temperature effect, an isochronous study designed for a period of three weeks at 40 °C was carried out. Each week, two randomly selected bottles were removed from the oven and placed under storage conditions (20 ± 5 °C). Determination of Cd was performed by ID-ICP-SFMS, As by SA-ICP-SFMS and Na and P by SA-ICP-OES on three subsamples per bottle.

The following acceptance criteria was applied:

$|b| < t_{0.95, n-2} \cdot s'_{b_i}$, where:

- b_i , slope
- s'_{b_i} , slope uncertainty
- n , number of time intervals

It can be concluded that analytes in the sample did not show significant instability after being exposed at 40 °C for 3 weeks. The results are summarized in Table 5 and graphically represented in Figure 5.

Table 5. Results of short-term stability assessment (at 40 °C for 3 weeks)

Measurand	Student's t-test		p-value
	Calculated test statistics	Critical value	
Arsenic	0.676	2.571	0.529
Cadmium	1.196	2.571	0.285
Sodium	0.176	2.571	0.867
Phosphorous	1.038	2.571	0.347

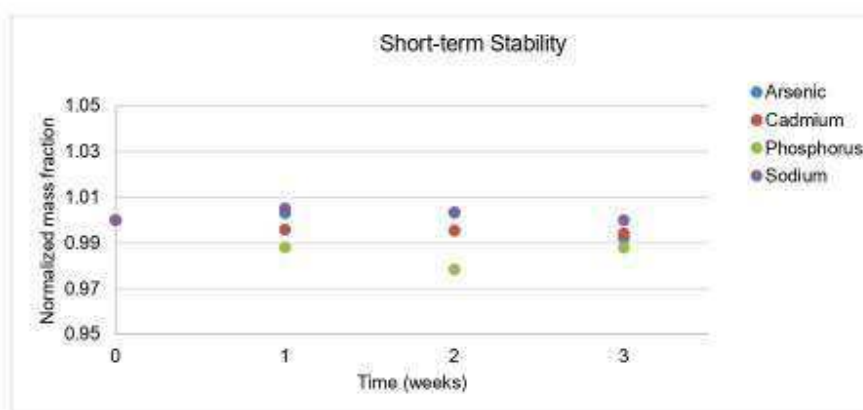


Figure 5. Short-term stabilities of the measurands at 40 °C for 3 weeks.

Long-term stability

Long term stability was assessed, using the classical approach, for a period that encompassed the sample dispatch and the completion of the supplementary comparison. Three bottles were randomly selected, and three subsamples were taken from each bottle. The results were assessed as for short-term stability.

The results are summarized in Table 6 and graphically represented in Figure 6. The Student's test confirmed that the slope of the lineal regression line was statistically insignificant at 95 % level of confidence.

Table 6. Results of long-term stability assessment

Measurand	Student's t-test		p-value
	Calculated test statistics	Critical value	
Arsenic	1.415	2.776	0.529
Cadmium	0.138	2.365	0.894
Sodium	1.547	2.776	0.197
Phosphorous	1.925	2.365	0.096

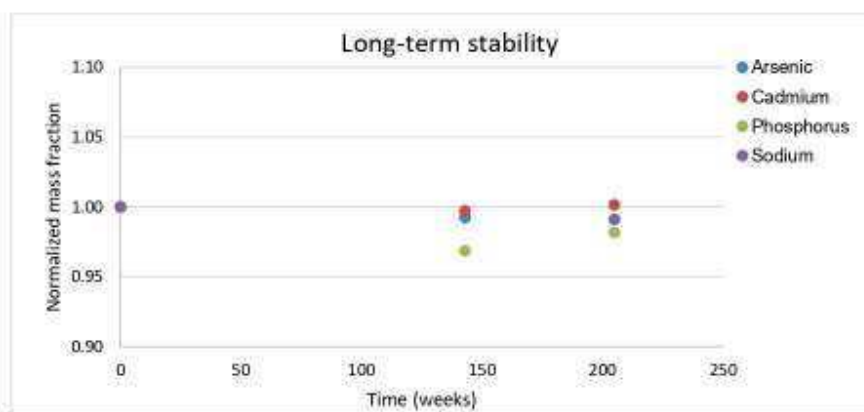


Figure 6. Long-term stability

PARTICIPANTS AND INSTRUCTIONS

The call for participation was distributed in April 2021 and samples were dispatched in June 2021 via DHL express. See Table 1 for a detailed study timeline. Appendix A and B reproduces the Study Protocol and Registration form respectively.

Table 7 lists the institutions that registered for SIM.QM-S11 in alphabetical order.

Table 7. Institutes registered for SIM.QM-S11

NMI or DI	Code	Country	Contact
Instituto Nacional de Tecnología Industrial	INTI	Argentina	Mabel Puelles, Osvaldo Acosta, Hernan Lozano
Instituto Boliviano de Metrología	IBMETRO	Bolivia	Evelyn Mendoza, Paola Avendaño
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia	INMETRO	Brazil	Rodrigo Cacicano de Sena, Marcelo Dominguez de Almeida
Instituto de Salud Pública de Chile	ISP	Chile	Soraya Sandoval Riquelme, Javier Vera
Instituto Nacional de Metrología de Colombia	INM	Colombia	Diego A. Garzón Z., Carlos A. España S.
Laboratorio Costarricense de Metrología	LACOMET	Costa Rica	Bryan Calderón Jiménez, Jimmy Venegas Padilla, Katia Rosales Ovarés
National Laboratory of Chemical Metrology / General Chemical State Laboratory – Hellenic Institute of Metrology	EXHM	Greece	Elias Kakoulides
Centro Nacional de Metrología	CENAM	Mexico	Maria del Rocio Arvizu Torres
Instituto Nacional de Calidad	INACAL	Peru	Elmer Carrasco Solis, Christian Uribe
Ural Research Institute for Metrology - Affiliated branch of the D.I. Mendeleyev Institute for Metrology	VNIIM-UNIIM	Russia	Egor Sobina, Alena Sobina
Health Sciences Authority	HSA	Singapore	Richard Shin
Jožef Stefan Institute	JSI	Slovenia	Radojko Jačimović
National Metrology Institute of South Africa	NMISA	South Africa	Maré Linsky
National Institute of Metrology Thailand	NIMT	Thailand	Pranee Phukphathanachai
Laboratorio Tecnológico del Uruguay	LATU	Uruguay	Ramiro Pérez Zambra, Romina Napoli

Most Institutes received the samples in the period from the end of June to the beginning of July 2021. Due to customs issues, a second sample was sent to INMETRO in September 2021, and INTI received the sample at its laboratory in November 2021. The initial deadline for reporting was October 30, 2021. However, due to shipment delays and the COVID-19 pandemic situation in some institutes, the deadline was rescheduled to February 2022.

To monitor the temperature during transportation and determine whether it exceeded the specified limit of 40 °C, a temperature strip monitor was attached to the samples. No NMI reported that the monitored samples reached temperatures above 40 °C.

In total, 14 of the 15 registered Institutes reported results, because one institute reported issues with the measurement instrument. Besides, LACOMET could only report results for phosphorus due to problems with the sample preparation equipment. INMETRO registered for participation for As, Cd, Na and P but only reported results for Cd.

Participants were instructed to send their results to the coordinator laboratory using the supplied reporting template reproduced in Appendix C. Final results and uncertainty budget were expected to be reported on a dry mass basis from at least five independent replicate measurements in mg/kg for As, Cd and Na, and in mg/g for P.

The participating NMIs/DIs were also asked to include a detailed description of the sample preparation methods, analytical techniques, calibration approach, reference material used for calibration and any correction applied.

RESULTS

Participants were requested to report a single estimate of the mass fraction in mg/kg for As, Cd and Na, and in mg/g for P. In addition to the quantitative results, participants were instructed to describe their analytical methods and approach to uncertainty estimation.

Results were discussed with SIM members. Draft A1 was distributed to all participants in October and presented at the CCQM IWG meeting held in November 2024.

After discussions with experts, VNIM-UNIM's phosphorus results were included in the SCRv calculation, as they used a primary method to assess the purity of the standard employed for their in-house reference material.

Draft A2 was distributed to all participants in March 2025 and presented at the CCQM IWG meeting held in April 2025.

Methods Used by Participants

Participants were free to use a method of their choice for both sample preparation and measurement method. Table 8 summarizes the sample preparation method, calibration method, analytical instrument as well as the reference material used by the participating NMIs/DIs for SIM-QM-S11.

Table 8. Summary of measurement methods and reference materials (for calibration) used.

Participant	Measurands	Sample preparation method	Calibration method	Analytical instrument	Reference material used for calibration (traceability)
INT1	As, Cd, Na, P	Microwave assisted digestion: As, P: 0.5 g sample + 4 ml HNO₃ Na, Cd: 0.5 g sample + 4 ml HNO₃ + 0.5 HF	As: Standard addition with Ge as internal standard Cd: Standard addition with In as internal standard Na and P: External calibration (calibration curve calculated intercept)	As and Cd: ICP-QMS Na and P: ICP-OES	As: NIST SRM 3103a Cd: NIST SRM 3108 Na: NIST SRM 3152a P: NIST SRM 3139a

EXHM	As, Cd, Na, P	Microwave assisted digestion: 0.5 g sample + 4 ml HNO ₃	Standard addition	ICP-SPMS	As: NIST SRM 3103a Cd: NIST SRM 3108 Na: NIST SRM 3152a P: NIST SRM 3130a
JSI	As, Cd, Na	As and Cd: Microwave assisted digestion: 0.15 g sample + 2 ml HNO ₃ + 0.02 ml HF Na: 0.46/0.47 g was sealed into a pure polyethylene ampoule.	As and Cd: External calibration with Sc, Y, Rh and Gd as internal standards Na: k0-NAA	As: ICP-QQQMS (O ₂) Cd: ICP-QQQMS (He) Na: TRIGA Mark II nuclear reactor (250 kW), HPGe detector	As: NIST SRM 3103a Cd: NIST SRM 3108 Na: ERM-E8530
CENAM	Na	Microwave assisted digestion: 0.5 g sample + 12 ml HNO ₃ + 0.5 ml HF	Standard addition with Sr as internal standard	ICP-OES	Na: NIST SRM 3152a
HSA	As, Cd	Microwave assisted digestion: 0.5-1 g sample + 5 ml HNO ₃ + 0.2 ml HF + 2 ml H ₂ O ₂	As: Standard addition with Ga as internal standard Cd: Exact-matching isotope dilution (¹¹⁴ Cd/ ¹¹⁰ Cd)	As: ICP-SPMS (HFO) Cd: ICP-QMS (He)	As: NIST SRM 3103a Cd: NIST SRM 3108
INMC	Cd, Na	Microwave assisted digestion: 0.5 g sample + 4 ml HNO ₃ + 2 ml H ₂ O ₂	Cd: Standard addition with In as internal standard Na: External calibration (Bracketing)	Cd: ICP-QMS Na: F-AAS	Cd: NIST SRM 3108 Na: NIST SRM 919b

INMETRO	Cd	Microwave assisted digestion: 0.5 g sample + 4 ml HNO ₃ + 2 ml H ₂ O ₂ + 0.2 ml HF	Standard addition	ICP-QMS	Cd: NIST SRM 3108
ISP	As, Cd	Microwave assisted digestion: 0.5 g sample + 5 ml HNO ₃ + 2 ml H ₂ O ₂	As: Standard addition with Ge as internal standard Cd: Standard addition with Se as internal standard	As and Cd: ICP-QMS (Hr)	As: NIST SRM 3103a Cd: NIST SRM 3108
LATU	As, Cd, Na, P	Microwave assisted digestion: 0.5 g sample + 5 ml HNO ₃ + 0.5 ml HF + 2 ml H ₂ O ₂ + 2 ml H ₂ O	As: Standard addition with Ge as internal standard Cd: Exact-matching isotope Dilution (¹¹¹ Cd/ ¹¹³ Cd) Na and P: Standard addition	As: ICP-SFMS (HR) Cd: ICP-SFMS (LR) Na and P: ICP-OES	As: NIST SRM 3103a Cd: NIST SRM 3108 Na: NIST SRM 3152a P: NIST SRM 3130a
LCM	P	Dry ashing: 2.0 g digested using dry ashing and extracted with 10 ml HCl	External Calibration	UV-visible Spectrophotometry	P: NIST SRM 3130a
INACAL	As, Cd	Microwave assisted digestion: As: 0.5 g sample + 7 ml HNO ₃ + 1 ml H ₂ O ₂ Cd: 0.5 g sample + 8 ml HNO ₃ + 2 ml H ₂ O ₂	As: Standard addition with In as internal standard Cd: Standard addition	As: ICP-QMS Cd: GFAAS	As: NIST SRM 3103a Cd: NIST SRM 3108
VNEM-UNIM	As, Cd, Na, P	Microwave assisted digestion: 0.5 g sample + 5 ml HNO ₃ + 0.1 ml HF + 0.5 ml H ₂ O ₂	Standard addition	ICP-QMS (standard and KED mode)	UNIM in-house reference material, prepared using high pure substance

NMISA	As, Cd, Na, P	Microwave assisted digestion: 0.5 g sample + 8 ml HNO ₃ + 0.5 ml HF	As and Na: External calibration and Standard addition Cd: Double Isotope Dilution P: Standard addition	As: ICP-QQQMS (D ₂) Cd: ICP-SFMS (HR) Na: ICP-QQQMS (He) and ICP-SFMS (HR) P: ICP-SFMS (HR)	As: NIST SRM 3103a Cd: NIST SRM 3108 Na: NIST SRM 3152a P: NIST SRM 3139a
NIMT	As, Cd, Na, P	Microwave assisted digestion: 0.5 g sample + 7.5 ml HNO ₃ + 0.1 ml HF + 0.5 ml H ₂ O ₂	As: Standard addition with Rh as Internal standard Cd: Isotope Dilution (¹¹² Cd/ ¹¹⁴ Cd) Na and P: Standard addition with internal standard	As: ICP-QQQMS (D ₂) Cd: ICP-QQQMS Na and P: ICP-OES	As: NIST SRM 3103a Cd: NIST SRM 3108 Na: Inorganic Ventures CQNA1 P: Inorganic Ventures CGP1

JSI was questioned about their decision to use 0.15 g as the sample mass. Their response was "...we used our standard procedure for this type of sample, where we have limitations on the digestion instruments used..."

All NMIs/OIs participating in SIM-QM-S11, excluding NIMT for Na and P, have ensured the metrological traceability of their outcomes in accordance with CPM traceability requirements. Most of the participating NMIs/OIs used the following certified reference materials from NIST: SRM 3103a Arsenic; SRM 3108 Cadmium; SRM 3152a Sodium and SRM 3139a Phosphorus.

NIMT utilized commercial standards of sodium and phosphorus. Consequently, in accordance with CPM traceability requirements, since these calibrants were not provided by a National Metrology Institute, the results will not be used for SCRv calculation.

Dry mass correction factor

Participants were instructed to determinate moisture content on a minimum of three separate portions of 1 g. Table 9 summarizes the dry mass correction factor calculated by each institute.

Table 9. Dry mass correction factor calculated by each institute.

Participant	Number of samples	Moisture content (%) (SD)	Dry mass correction factor
INTI	5	4.54 (0.20)	0.9546
EXHM	5	4.51 (0.024)	0.9549
JSI	4	6.1112 (0.0129)	0.9389
CENAM	8	6.37 (0.86)	0.9363
HSA	6	5.5927 (0.0441) 6.6039 (0.020)	0.9440 0.9340
INMC	3	6.788 (0.031)	0.9321
INMETRO	4	6.91 (0.025)	0.9309
ISP	5	5.735 (0.064)	0.9426
LATU	5	6.78 (0.13)	0.9322
LACOMET	5	7.0838 (0.05)	0.9292
INACAL	3	6.96 (0.096)	0.9304
VNIIM-UNIIM	10	6.10 (0.15)	0.9390
NMISA	5	7.354 (0.026)	0.9265
NIMT	3	6.38 (0.05)	0.9362

HSA was questioned about the two different moisture content results and the participant answer: "The results were corrected for moisture based on the respective bottle used for analysis".

Participant's results for arsenic, cadmium, sodium and phosphorus

The results for SIM.QM-S11 for the determination of arsenic, cadmium, sodium and phosphorus are detailed in Tables 10 to 13 and presented graphically in Figures 7 to 10.

Participant's results for arsenic

Ten laboratories reported values for mass fraction of arsenic. The results for SIM.QM-S11 for the determination of arsenic are detailed in Table 10 and presented graphically in Figure 7.

Table 10. Reported results for arsenic.

Participant	Reported mass fraction (mg/kg)	Reported standard uncertainty (mg/kg)	Coverage factor, k	Expanded uncertainty (mg/kg)
HSA	0.0528	0.0015	2.57	0.0039
NIMT	0.053	0.001	2	0.002
LATU	0.0565	0.0014	2	0.0029
ISP	0.0575	0.0016	2	0.0033
NMISA	0.0576	0.0029	2	0.0058
JSI	0.0583	0.0022	2	0.0044
INTI	0.0608	0.0031	2	0.0062
EXHM	0.0630	0.0034	2	0.0068
INACAL	0.070	0.002	2	0.004
VNIIM-UNIIM	0.078	0.003	2	0.006

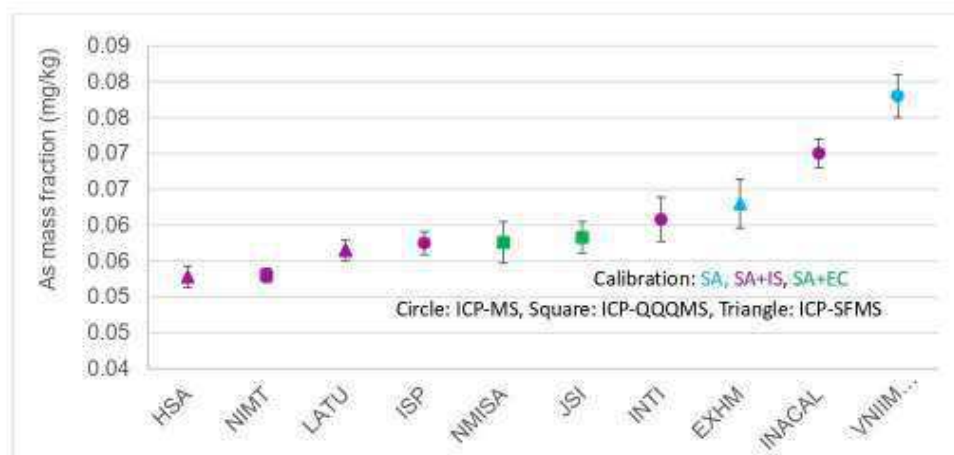


Figure 7. Reported results for arsenic (mg/kg). Error bars represent reported standard uncertainties.

Participant's results for cadmium

Twelve laboratories reported values for mass fraction of cadmium. The results for SIM.QM-S11 for the determination of cadmium are detailed in Table 11 and presented graphically in Figure 8.

Table 11. Reported results for cadmium.

Participant	Reported mass fraction (mg/kg)	Reported standard uncertainty (mg/kg)	Coverage factor, k	Expanded uncertainty (mg/kg)
INMC	0.720	0.0200	1.97	0.039
JSI	0.728	0.023	2	0.046
ISP	0.732	0.011	2	0.023
NIMT	0.750	0.007	2	0.015
HSA	0.7504	0.0074	2.57	0.0190
VNIIM-UNIIM	0.76	0.02	2	0.040
LATU	0.760	0.013	2	0.025
INMETRO	0.766	0.0205	2	0.041
NMISA	0.766	0.023	2	0.046
INACAL	0.795	0.022	2	0.044
INTI	0.800	0.0421	2	0.0842
EXHM	0.810	0.035	2	0.071

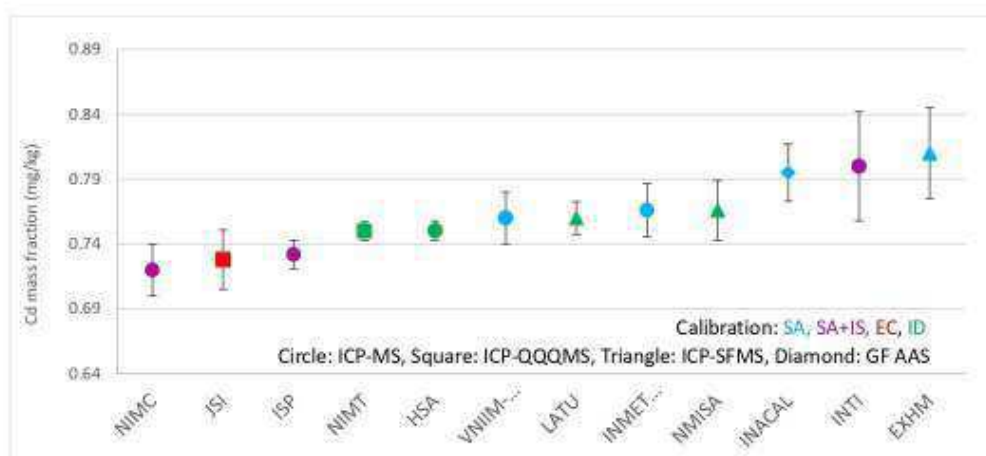


Figure 8. Reported results for cadmium (mg/kg). Error bars represent reported standard uncertainties.

Participant's results for sodium

Nine laboratories reported values for mass fraction of sodium. The results for SIM.QM-S11 for the determination of sodium are detailed in Table 12 and presented graphically in Figure 9.

Table 12. Reported results for sodium.

Participant	Reported mass fraction (mg/kg)	Reported standard uncertainty (mg/kg)	Coverage factor, k	Expanded uncertainty (mg/kg)
INMC	27.1	0.513	1.97	1.0
INTI	32.14	1.85	2	3.69
VNIIM-UNIIM	33.1	1.05	2	2.1
NMISA	33.1	1.9	2	3.8
CENAM	33.8	0.27	2.1	0.57
LATU	34.05	0.55	2	1.10
JSI	34.1	1.2	2	2.4
NIMT	36.7	0.6	2	1.3
EXHM	37.65	2.14	2	4.28



Figure 9. Reported results for sodium (mg/kg). Error bars represent reported standard uncertainties.

Participant's results for phosphorus

Seven laboratories reported values for mass fraction of phosphorus. The results for SIM.QM-S11 for the determination of phosphorus are detailed in Table 13 and presented graphically in Figure 10.

Table 13. Reported results for phosphorus.

Participant	Reported mass fraction (mg/g)	Reported standard uncertainty (mg/g)	Coverage factor, k	Expanded uncertainty (mg/g)
NIMT	1.65	0.02	2	0.05
LACOMET	1.667	0.016	2	0.031
NMISA	1.70	0.054	2	0.11
LATU	1.735	0.028	2	0.057
VNIIM-UNIIM	1.736	0.060	2	0.120
EXHM	1.802	0.080	2	0.159
INTI	1.824	0.036	2	0.073

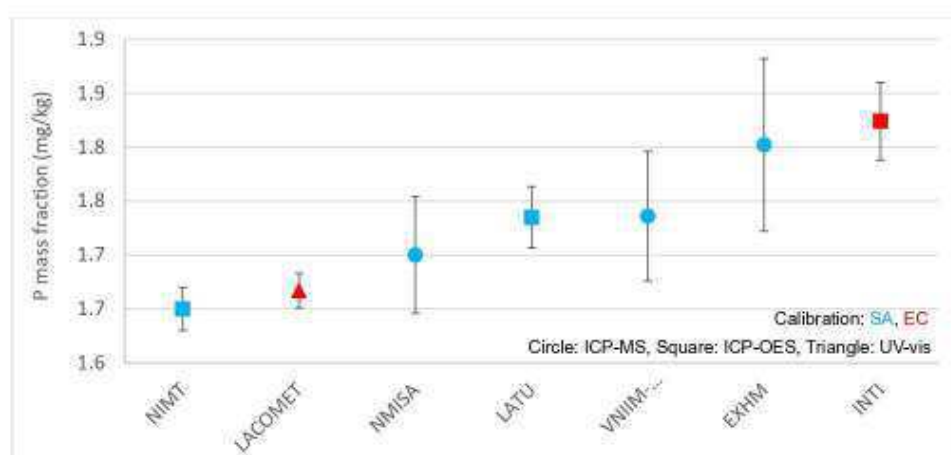


Figure 10. Reported results for phosphorus (mg/g). Error bars represent reported standard uncertainties.

Discussion of results

Nearly all institutes employed microwave-assisted digestion methods for sample preparation. ICP-MS techniques were used for arsenic and cadmium quantification, except for INACAL, which used GF-AAS for cadmium. The most used analytical techniques for the determination of sodium and phosphorus were ICP-OES and ICP-MS. Other techniques used included FAAS, UV-Vis spectrometry, and K0-INAA. Standard addition was used by most institutes for cadmium, arsenic, and phosphorus. Some institutes used isotope dilution for cadmium quantification. For sodium, standard addition and external calibration were the most used calibration techniques.

DETERMINATION OF SUPPLEMENTARY COMPARISON REFERENCE VALUES (SCRV)

DEGREES OF EQUIVALENCE (DoE)

The NIST decision tree (version 1.0.4) was utilized to estimate the SCRv, as well as to determine the degrees of equivalence for each NMI/DI. The selected models for each element were those suggested by the NIST decision tree. The results of the hypothesis tests for homogeneity, symmetry, and normality conducted by the NIST decision tree, as well as the recommended statistical model and the degrees of equivalence for each element, are presented in Appendix D.

The participant's results relative to the SCRv estimation using the NIST decision tree and the degrees of equivalence estimates are presented in Figures 11 to 18.

The NIST decision tree hypothesis test results as well the SCRv and associated uncertainties for each element are presented in Tables 14, 16, 18 and 20.

Degrees of equivalence for each element, along with the reported value (x_i) and its standard uncertainty (u_i) (adjusted to include the dark uncertainty, if required) are presented in Tables 15, 17, 19 and 21. Adjustment for dark uncertainty was made when the participant's result disagreed with the SCRv without including tau.

Arsenic

Table 14 shows the decision tree hypothesis test results for arsenic in SIM.QM-S11. The NIST decision tree recommends using the Hierarchical Skew Student-Gauss approach.

Table 14. Decision tree hypothesis test results for arsenic.

Decision tree hypothesis	Results	Answers
Cochran's test for Homogeneity	$p < 0.001$ $Q = 120.1$ (Reference distribution: Chi-Square with 9 Degrees of Freedom) $\text{Tau est.} = 0.006442$ $\text{Tau/median (x)} = 0.1112$ $\text{Tau/median (u)} = 3.068$	Assume Homogeneity? No
Miao-Gel-Gastwirth test for Symmetry	$p = 0.0288$	Assume Symmetry? No
Shapiro-Wilk test for Normality	$p = 0.42325$	Assume Normality? -
Recommended Approach		Hierarchical Skew Student-Gauss
SCRV, mg/kg		0.057506
Standard Uncertainty (u), mg/kg		0.0025487
Dark Uncertainty (σ), mg/kg		0.0034787

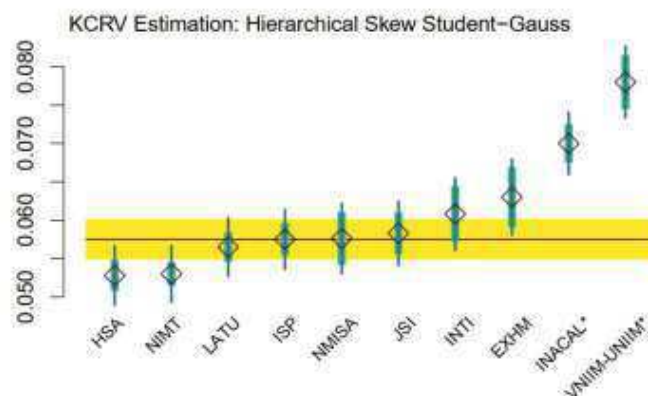


Figure 11. SCR value estimation for arsenic using Hierarchical Skew Student-Gauss model. The black horizontal line represents the SCR value and the yellow shading around the SCR value represents the $u(\text{SCR})$. For each participant's data point, the heavy vertical bar is their reported uncertainty, and the skinny extension is the contribution of dark uncertainty.

Table 15. Degrees of equivalence for arsenic. In the u_i column, all values are those reported by the participants, unless accompanied by an asterisk (*). Those values accompanied by an asterisk (*) are the reported values and tau summed in quadrature.

Participant	x_i (mg/kg)	u_i (mg/kg)	d_i (mg/kg)	$U(d_i)$ (mg/kg)	$d/U(d_i)$
HSA	0.0528	0.0015	-0.00471	0.00716	-0.65700
NIMT	0.053	0.001	-0.00451	0.00626	-0.71998
LATU	0.0565	0.0014	-0.00101	0.00663	-0.15173
ISP	0.0575	0.0016	-0.00001	0.00685	-0.00088
NMISA	0.0576	0.0029	0.00009	0.00856	0.01098
JSI	0.0583	0.0022	0.00079	0.00757	0.10485
INTI	0.0608	0.0031	0.00329	0.00888	0.37095
EXHM	0.0630	0.0034	0.00549	0.00926	0.59350
INACAL*	0.070	0.0040*	0.01249	0.01199	1.04238
VNIIM-UNIIM*	0.078	0.0046*	0.02049	0.01282	1.59922

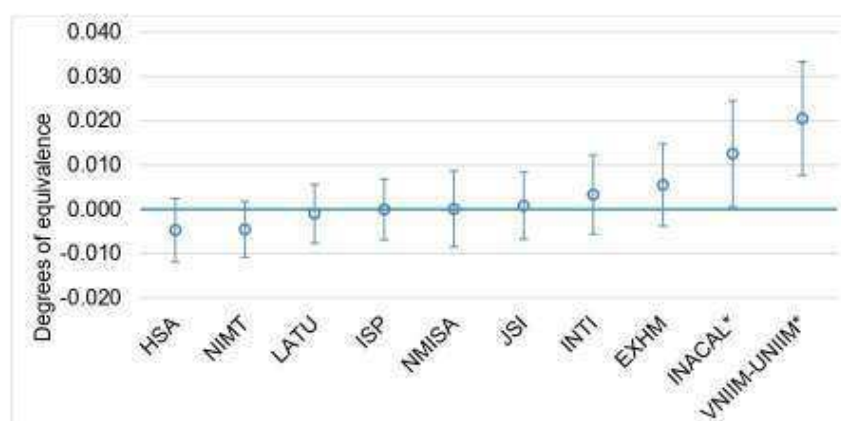


Figure 12. Degrees of equivalence for arsenic (using Hierarchical Skew Student-Gauss model)

Based on the IAWG guidance for making and evaluating CMC claims, the arsenic results from INACAL and VNIIM-UNIIM do not comply with the SCRv value when applying the DoE Recognizing Dark Uncertainty. Therefore, these results should not be used to support CMC claims.

Cadmium

Table 16 shows the decision tree hypothesis test results for cadmium in SIM.QM-S11. The NIST decision tree recommends using the Adaptive Weighted Average approach.

Table 16. Decision tree hypothesis test results for cadmium.

Decision tree hypothesis	Results	Answers
Cochran's test for Homogeneity	p= 0.13 Q= 16.25 (Reference distribution: Chi-Square with 11 Degrees of Freedom) Tau est. = 0.009829 Tau/median (x)= 0.01293 Tau/median (u)= 0.4854	Assume Homogeneity? Yes
Miao-Gel-Gastwirth test for Symmetry	p= 0.7278	Assume Symmetry? -
Shapiro-Wilk test for Normality	p= 0.5068	Assume Normality? Yes
Recommended Approach		Adaptive Weighted Average
SCRV, mg/kg		0.7526
Standard Uncertainty (u), mg/kg		0.0054227
Dark Uncertainty (σ), mg/kg		0.0098293

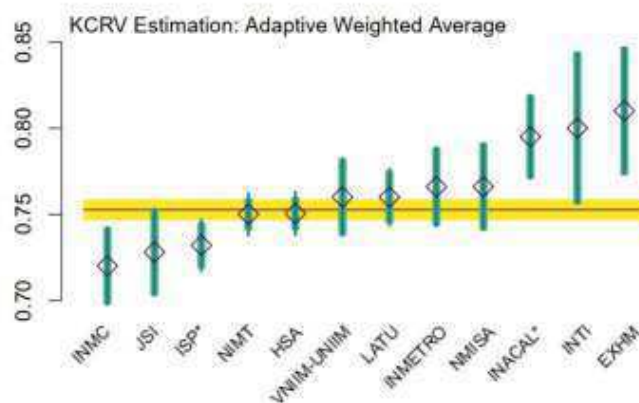


Figure 13. SCR estimation for cadmium using Adaptive Weighted Average model. The black horizontal line represents the SCR and the yellow shading around the SCR represents the $u(\text{SCR})$. For each participant's data point, the heavy vertical bar is their reported uncertainty, and the skinny extension is the contribution of dark uncertainty.

Table 17. Degrees of equivalence for cadmium. In the u_i column, all values are those reported by the participants, unless accompanied by an asterisk (*). Those values accompanied by an asterisk (*) are the reported values and tau summed in quadrature.

Participant	x_i (mg/kg)	u_i (mg/kg)	d_i (mg/kg)	$U(d_i)$ (mg/kg)	$d/U(d_i)$
INMC	0.720	0.0200	-0.03260	0.03781	-0.86216
JSI	0.728	0.023	-0.02460	0.04415	-0.55717
ISP*	0.732	0.015*	-0.02060	0.02825	-0.72928
NIMT	0.750	0.007	-0.00260	0.01284	-0.20252
HSA	0.7504	0.0074	-0.00220	0.01423	-0.15462
VNIIM-UNIIM	0.76	0.02	0.00740	0.03787	0.19540
LATU	0.760	0.013	0.00740	0.02429	0.30464
INMETRO	0.766	0.0205	0.01340	0.03939	0.34020
NMISA	0.766	0.023	0.01340	0.04361	0.30725
INACAL*	0.795	0.024*	0.04240	0.04709	0.90040
INTI	0.800	0.0421	0.04740	0.08142	0.58219
EXHM	0.810	0.035	0.05740	0.06876	0.83480

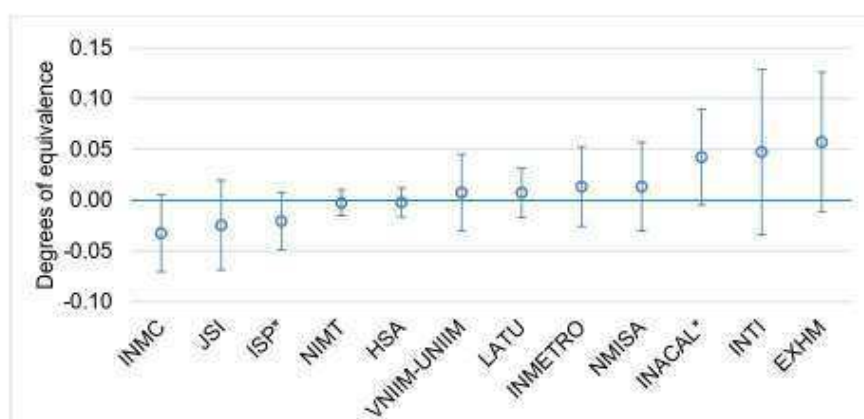


Figure 14. Degrees of equivalence for cadmium

Sodium

Table 18 shows the decision tree hypothesis test results for sodium in SIM.QM-S11. The NIST decision tree recommends using the Hierarchical Laplace-Gauss approach.

Table 18. Decision tree hypothesis test results for sodium.

Decision tree hypothesis	Results	Answers
Cochran's test for Homogeneity	$p < 0.001$ $Q = 148.8$ (Reference distribution: Chi-Square with 7 Degrees of Freedom) $\text{Tau est.} = 3.188$ $\text{Tau/median (x)} = 0.09531$ $\text{Tau/median (u)} = 2.834$	Assume Homogeneity? No
Miao-Gel-Gastwirth test for Symmetry	$p = 0.6412$	Assume Symmetry? Yes
Shapiro-Wilk test for Normality	$p = 0.0002022$	Assume Normality? No
Recommended Approach		Hierarchical Laplace-Gauss
SCRV, mg/kg		33.46
Standard Uncertainty (u), mg/kg		0.6635
Dark Uncertainty (σ), mg/kg		2.179

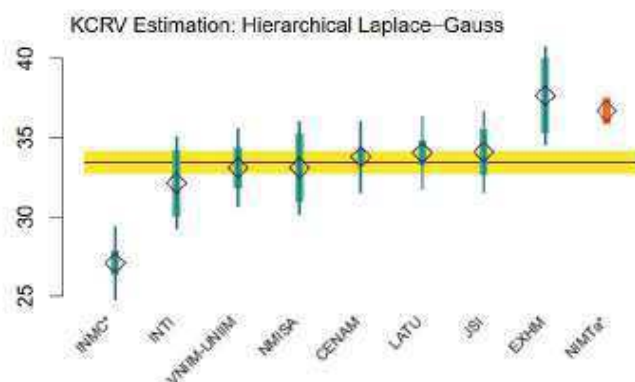


Figure 15. SCRv estimation for sodium using Hierarchical Laplace-Gauss model. The black horizontal line represents the SCRv and the yellow shading around the SCRv represents the $u(\text{SCRv})$. For each participant's data point, the heavy vertical bar is their reported uncertainty, and the skinny extension is the contribution of dark uncertainty. Results in red are the ones not used for SCRv calculations.

Table 19. Degrees of equivalence for sodium. In the u_i column, all values are those reported by the participants, unless accompanied by an asterisk (*). Those values accompanied by an asterisk (*) are the reported values and tau summed in quadrature.

Participant	x_i (mg/kg)	u_i (mg/kg)	d_i (mg/kg)	$U(d_i)$ (mg/kg)	$d/U(d_i)$
INMC*	27.1	2.24*	-6.4	5.550	-1.146
INTI	32.14	1.85	-1.32	3.903	-0.338
VNIIM-UNIIM	33.1	1.05	-0.4	2.473	-0.146
NMISA	33.1	1.90	-0.4	3.999	-0.090
CENAM	33.8	0.27	0.3	1.445	0.235
LATU	34.05	0.55	0.59	1.726	0.342
JSI	34.1	1.20	0.6	2.729	0.235
EXHM	37.65	2.14	4.19	4.505	0.930
NIMT ^{a*}	36.7	2.26*	3.2	5.543	0.585

^a not used in the SCRv calculations.

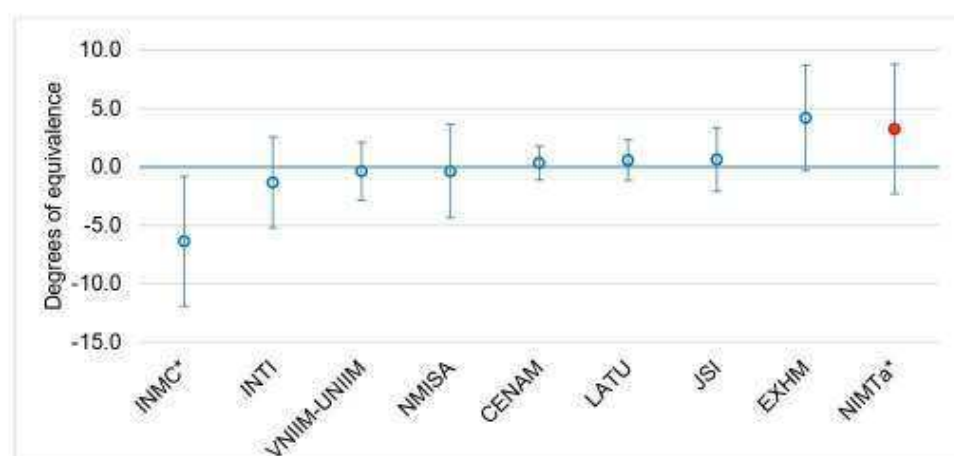


Figure 16. Degrees of equivalence for sodium

Based on the IAWG guidance for making and evaluating CMC claims, the sodium result from INMC do not comply with the SCRv value when applying the DoE Recognizing Dark Uncertainty. Therefore, this result should not be used to support CMC claims.

Phosphorus

Table 20 shows the decision tree hypothesis test results for phosphorus in SIM.QM-S11. The NIST decision tree recommends using the Hierarchical Gauss-Gauss approach.

Table 20. Decision tree hypothesis test results for phosphorus.

Decision tree hypothesis	Results	Answers
Cochran's test for Homogeneity	p= 0.0016 Q= 19.46 (Reference distribution: Chi-Square with 5 Degrees of Freedom) Tau est. = 0.05938 Tau/median (x)= 0.03422 Tau/median (u)= 1.32	Assume Homogeneity? No
Miao-Gel-Gastwirth test for Symmetry	p= 0.3098	Assume Symmetry? Yes
Shapiro-Wilk test for Normality	p= 0.3889	Assume Normality? Yes
Recommended Approach		Hierarchical Gauss-Gauss
SCRV, mg/g		1.738
Standard Uncertainty (u), mg/g		0.02325
Dark Uncertainty (σ), mg/g		0.05381

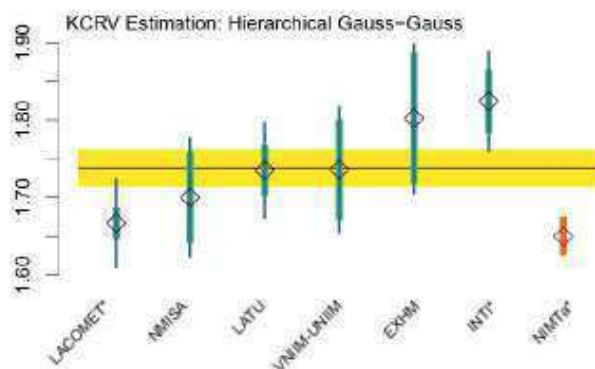


Figure 17. SCR estimation for phosphorus using Hierarchical Gauss-Gauss model. The black horizontal line represents the SCR and the yellow shading around the SCR represents the $u(\text{SCR})$. For each participant's data point, the heavy vertical bar is their reported uncertainty, and the skinny extension is the contribution of dark uncertainty. Results in red are the ones not used for SCR calculations.

Table 21. Degrees of equivalence for phosphorus. In the u_i column, all values are those reported by the participants, unless accompanied by an asterisk (*). Those values accompanied by an asterisk (*) are the reported values and tau summed in quadrature.

Participant	x_i (mg/g)	u_i (mg/g)	d_i (mg/g)	$U(d_i)$ (mg/g)	$d/U(d_i)$
LACOMET*	1.667	0.056*	-0.0710	0.1437	-0.4941
NMISA	1.70	0.054	-0.0380	0.1164	-0.3265
LATU	1.735	0.028	-0.0030	0.0724	-0.0415
VNIIM-UNIIM	1.736	0.060	-0.0020	0.1279	-0.0156
EXHM	1.802	0.080	0.0640	0.1635	0.3914
INTI*	1.824	0.065*	0.0860	0.1548	0.5556
NIMT*	1.65	0.057*	-0.0880	0.1453	-0.6056

^a not used in the SCRv calculations.

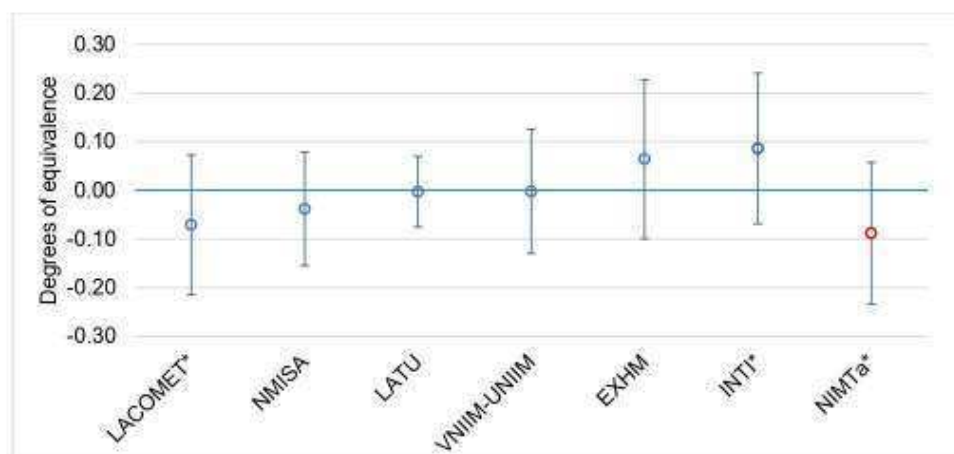


Figure 18. Degrees of equivalence for phosphorus

USE OF SIM.QM-S11 IN SUPPORT OF CALIBRATION AND MEASUREMENT CAPABILITY (CMC)

CLAIMS

How far the light shines, Core Capability Statements and CMC support

Successful participation in **SIM.QM-S11** demonstrates the following measurement capabilities in plants and other high silica content related materials:

- Arsenic: Metalloids and semi-metals at mass fraction levels above 20 µg/kg.
- Cadmium: Transition elements at mass fraction levels above 50 µg/kg (except Hg).
- Phosphorus: Non-metals (except: H, C, O, N) at mass fraction levels above 50 µg/kg.
- Sodium: Alkali and alkaline earth elements at mass fraction levels above 50 µg/kg.

Table 18 shows the Core Capability table with the measurement space covered by the study.

Table 22. Core Capability table

Analyte groups	Matrix challenges						Calibration materials and solutions
	Water/aqueous	High Silica content (e.g., Soils, sediments, plants, ...)	High salts content (e.g., Sea-water, urine, ...)	High organics content (e.g., high carbon) (e.g., Food, blood/serum, cosmetics, ...)	Difficult to dissolve metals (Autocatalysts, ...)	High volatile matrices (e.g. solvents, fuels, ...)	
Group I and II: Alkali and Alkaline earth (Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Ca, Sr, Ba)		Na					
Transition elements (Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ag, Cd, Ta, W, Au, Hg, Al, Ga, In, Tl, Pb, Po)		Cd					
Platinum Group elements (Ru, Rh, Pd, Os, Ir, Pt)							
Metalloids / Semi-metals (B, Si, Ge, As, Sb, Te, Se)		As					
Non-metals (P, S, C, N, O)		P					
Halogens (F, Cl, Br, I)							
Rare Earth Elements (Lanthanides, Actinides)							
Inorganic species (elemental, anions, cations)							
Small organo-metals							
Proteins							
Nanoparticles							
Low level (e.g. below 50 µg/kg)							
High level (e.g. above 50 µg/kg)							

CONCLUSION

For all measurands, most participating NMIs/DI's results were in agreement with the SCR.V without considering dark uncertainty.

For some participants who obtained values of $d/U(d)$ greater than one, agreement with the Standard Reference Value (SCR.V) was attained by expanding their uncertainty assessment to include dark uncertainty.

Contact Details

Elizabeth Ferreira
eferrei@latu.org.uy
+59826013724 ext1495
Laboratorio Tecnológico del Uruguay
Montevideo-Uruguay

Cecilia Geisenblosen
mgeisenb@latu.org.uy
+59826013724 ext1513
Laboratorio Tecnológico del Uruguay
Montevideo-Uruguay

Gimena Colombo
mcolombo@latu.org.uy
+59826013724 ext1513
Laboratorio Tecnológico del Uruguay
Montevideo-Uruguay

REFERENCES

International Organization for Standardization. (2017). Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability (ISO/GUIDE 35).

CIPM MRA-G-13 "Calibration and measurement capabilities in the context of the CIPM MRA. Guidelines for their review, acceptance and maintenance", Version 1.1, 30/03/2021.

NIST decision tree accessed February 2024, <https://decisiontree.nist.gov/>

Possolo, A., Koepke, A., Newton, D. and Winchester, M. (2021), Decision Tree for Key Comparisons, Journal of Research (NIST JRES), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, [online], <https://doi.org/10.6028/jres.126.007>

Appendix A. Study protocol



LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY

SIM.QM-S11

**Supplementary Comparison of elements in
Yerba mate (*Ilex paraguariensis*)**

Study Protocol

December 2020

**Ramiro Pérez Zambra, Romina Napoli, Elizabeth Ferreira
Montevideo-Uruguay**

1. INTRODUCTION

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae) is a native plant which grows in the subtropical regions of South America: Paraguay, Brazil, Argentina and Uruguay. It is consumed as an infusion called “mate” in the before mentioned countries as well as all around the world as tea. Due to safety reasons the mass fraction of arsenic and cadmium is constantly monitored. Besides, the mass fraction of nutrients as sodium and phosphorus is also measured for labeling purposes.

The aim of this comparison is to enable NMIs/DIs to demonstrate their competence in the determination of elements at low and high levels in vegetal material within the high silica content category.

2. TIMELINE

Sample preparation:	October, 2019
Homogeneity Testing:	April, 2020
Stability Testing:	October, 2020
Distribution of protocol and questionnaire:	December, 2020
Call for participation:	March, 2021
Registration deadline:	April, 2021
Distribution of samples:	July, 2021
Deadline for submission of results:	November, 2021
Preliminary discussion of results:	February, 2022

Table1: Timeline

3. MEASURANDS

Analyte and expected mass fraction (on a dry mass basis).

As: (0.02 – 1) mg/kg

Cd: (0.1 – 5) mg/kg

Na: (1 – 100) mg/kg

P: (500 – 5000) mg/kg

4. STUDY MATERIAL

4.1 Preparation

Several packs of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) from a batch with suspected contamination were purchased from the local market. Determinations were performed and it was confirmed that the sample contains arsenic and cadmium in quantifiable mass fractions. The sample was dried in a convection oven at 100 °C for 4 hours. After that, it was firstly grinded using a knife mill, in a second step using an ultra-centrifugal mill (particle size approx. 80 µm) and thoroughly mixed with a V-mixer. The obtained powder was bottled into pre-cleaned amber glass bottles. Each bottle contains approx. 25 g of material. Preliminary microbiological testing showed undetectable (< 10 UFM/g) quantities of aerobic mesophilic microbes, as well as yeast and mold. Nevertheless, the material was γ-irradiated with a dose of 23 kGy to guarantee sterilization.

4.2 Recommended Minimum sample amount

The recommended minimum sample amount for analysis is at least 0.5 g.

4.3 Dry mass determination

The dry mass correction determination must be performed on a minimum of three separate portions of 1 g each. Samples must be dried in an air-forced oven at (103 ± 2) °C for 2 hours. After cooling and weighing, introduce the samples again in the oven for one hour. Leave until the samples are cooled and weigh them again. Constant mass is achieved when the difference between successive weights is less than 0.002 g. If necessary, introduce the sample in the oven for one more hour. In general, constant mass is attained in the first 3 hours.

4.4 Homogeneity Assessment of Study Material

The homogeneity study was carried out according to ISO GUIDE 35:2017, using one-way ANOVA. Ten bottles were selected: the first one and the last one of the lot. The rest were chosen by stratified random sampling.

Determination of Cd was performed by ID-SFMS, As by SA-ICP-SFMS and Na and P by SA-ICP-OES on three subsamples per bottle and per parameter.

Results of F-Test are shown in the following table:

Element	F	F-critical
Arsenic	2.20	2.39
Cadmium	0.96	2.39
Sodium	1.67	2.39
Phosphorus	1.75	2.39

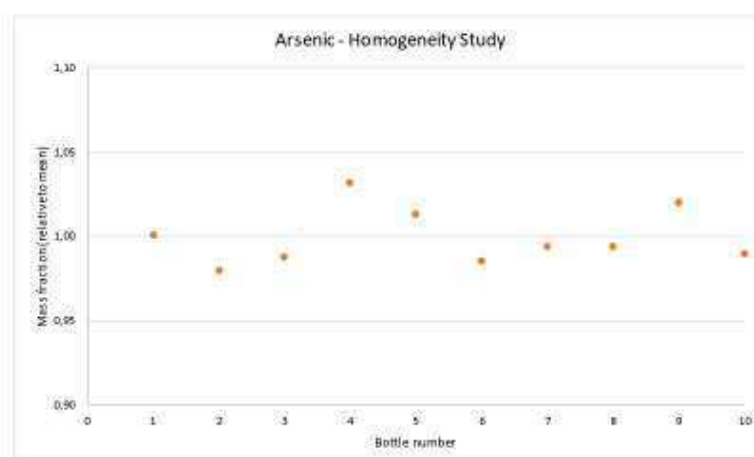
Table 2: Homogeneity F-Test Results

It can be concluded that analytes in the samples did not show significant inhomogeneity.

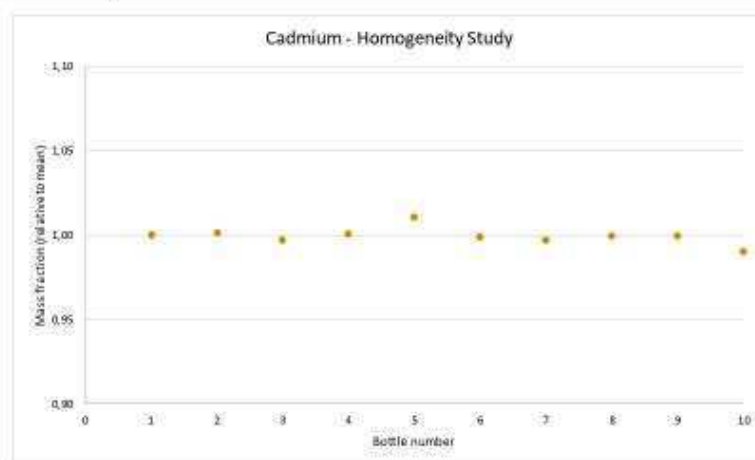
In the next table, variability figures are shown:

ANOVA Estimate	Arsenic	Cadmium	Sodium	Phosphorus
Within-packet, CV_{with} :	2.9%	0.88%	0.46%	0.54%
Between-packet, CV_{btw} :	2.0%	0.90%	0.28%	0.72%
Total analytical variability, CV:	2.3%	0.89%	0.33%	0.60%

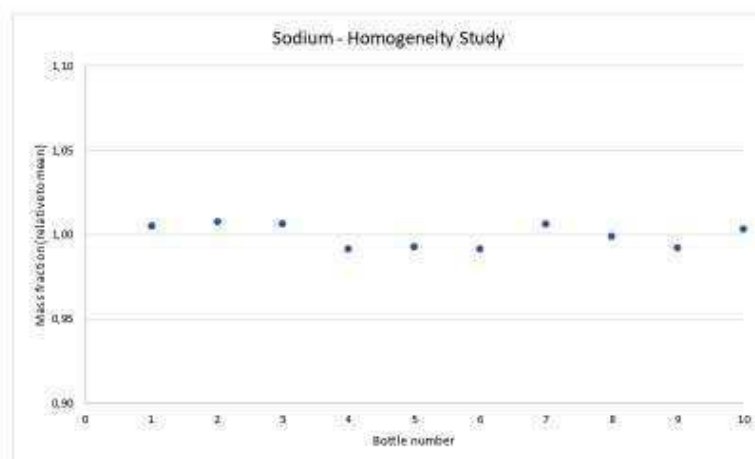
Table 3: Homogeneity ANOVA Results



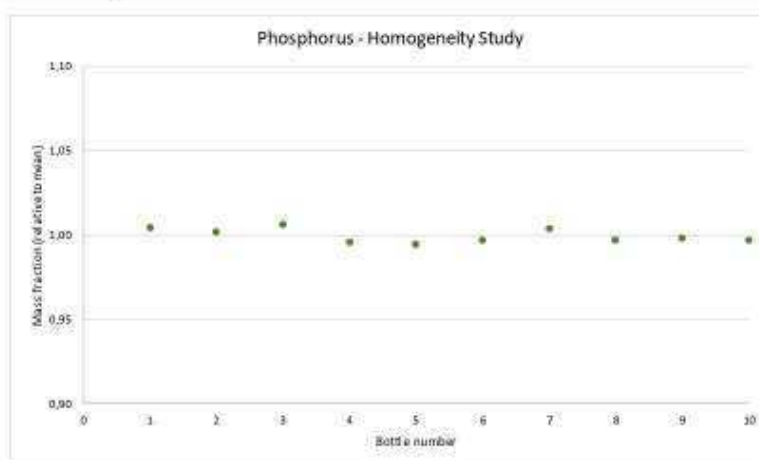
Graph 1: Homogeneity - Arsenic results per bottle



Graph 2: Homogeneity - Cadmium results per bottle



Graph 3: Homogeneity - Sodium results per bottle



Graph 4: Homogeneity - Phosphorus results per bottle

4.5 Stability Assessment of Study Material

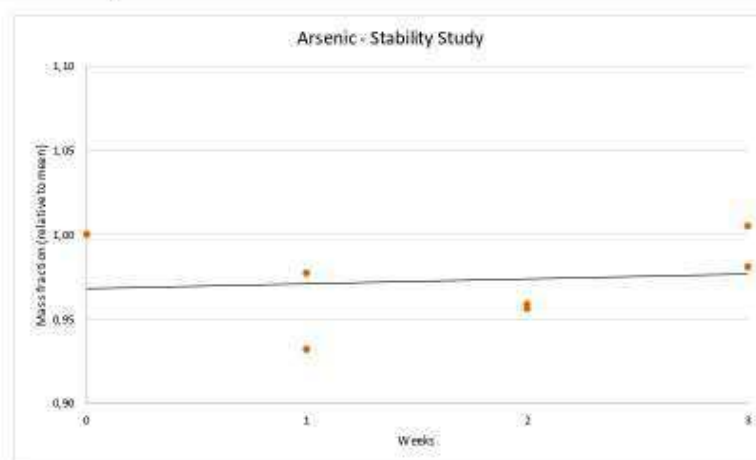
To evaluate a possible sample's instability during transportation due to temperature, an isochronous study was designed and carried out for a period of three weeks at 40 °C. Two bottles were removed from the oven each week. Determination of Cd was performed by ID-ICP-SFMS, As by SA-ICP-SFMS and Na and P by SA-ICP-OES on three subsamples per bottle and per parameter.

The following acceptance criteria was applied:

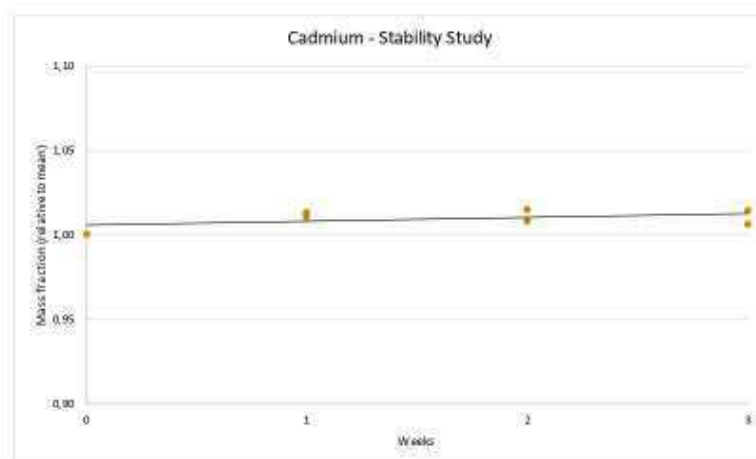
$|b| < t_{0.95; n-2} \cdot s \cdot b$, where

- b, slope
- s'b, slope uncertainty
- n, number of time intervals

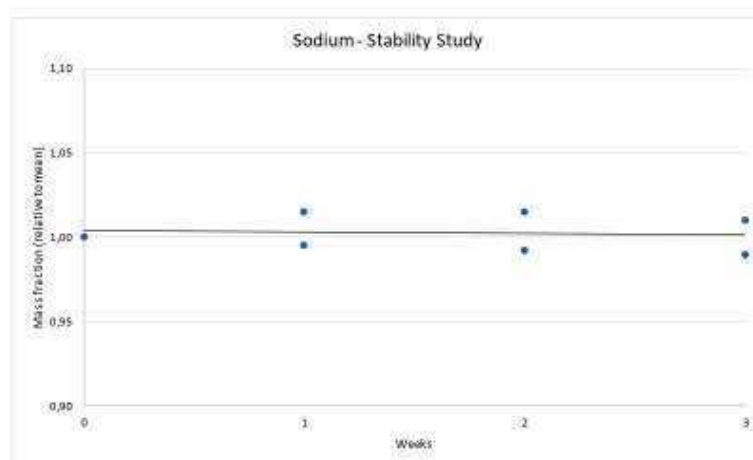
It can be concluded that analytes in the samples did not show significant instability after being exposed at 40°C for 3 weeks.



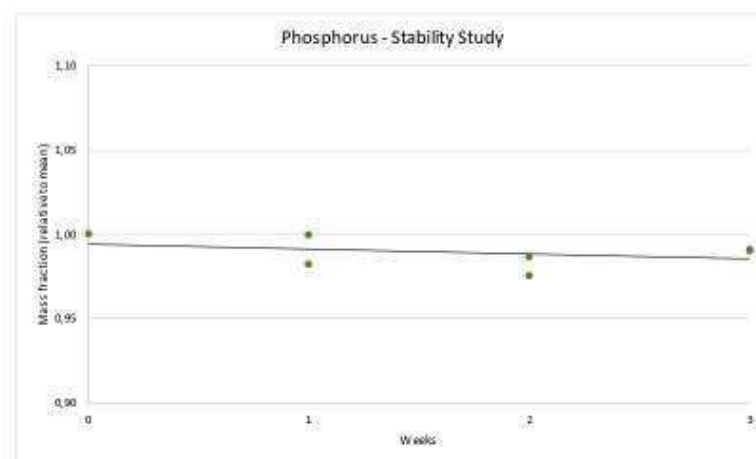
Graph 5: Stability study - Arsenic



Graph 6: Stability study - Cadmium



Graph 7: Stability study – Sodium



Graph 8: Stability study - Phosphorus

Long term stability studies will be carried out during the comparison schedule. Bottles which are stored at room temperature will be selected. Determination will be performed, and data will be evaluated as for short-term stability studies.

5. Instructions and sample distribution

A bottle containing 25 g of material will be sent to participants. A temperature label indicator will be attached to the bottle to establish whether maximum temperature has been reached during transportation. The material must be stored at room temperature, between 15 °C and 27 °C. Participants will be asked to return the sample receipt form in due time.

If the results of this comparison are to be used to support CMC claims, then the calibrations should be carried out by using standards with metrological traceability to the SI, in accordance with section 3 in CIPM MRA-G-13 (<https://www.bipm.org/utils/common/documents/CIPM-MRA/CIPM-MRA-G-13.pdf>). Commercially available calibration materials usually should not be employed.

6. Report of results

Final results should be returned to the coordinator laboratory using the supplied reporting template.

All participants must include:

- Final results and uncertainty budget, reported as mg/kg on dry mass basis, from at least 5 independent replicate measurements.
- A detailed description of sample preparation methods, analytical techniques, calibration approach, calibration standards, and any correction applied.

7. Use of SIM.QM-S11 in support of calibration and measurement capability (CMC) claims

7.1 How far the light shines

Successful participation in this supplementary comparison will help demonstrate capabilities for the determination of elements in plants and other high silica content related materials.

It will support CMCs in the groups:

- Arsenic: Metalloids and semi-metals at mass fraction levels above 20 µg/kg.
- Cadmium: Transition elements at mass fraction levels above 50 µg/kg.
- Phosphorus: Non-metals (except: C, O, N) at mass fraction levels above 50 µg/kg.
- Sodium: Alkali and alkaline earth elements at mass fraction levels above 50 µg/kg.

7.2 Core Capability table

Analyte groups	Matrix challenges						Calibration materials and solutions
	Water/aqueous	High Silica content (e.g. Soils, sediments, plants, ...)	High salts content (e.g. Seawater, urine, ...)	High organics content (e.g. high carbon) (e.g. Food, blood/serum, cosmetics, ...)	Difficult to dissolve metals (Autocatalysts, ...)	High volatile matrices (e.g. solvents, fuels, ...)	
Group I and II: Alkali and Alkaline earth (Li, Na, K, Rb, Cs, Ba, Mg, Ca, Sr, Be)		Yes					
Transition elements (Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ag, Cd, Ta, W, Au, Hg, Al, Ga, In, Tl, Pb, Bi)		Yes					
Platinum Group elements (Ir, Rh, Pd, Os, Pt, Ni)							
Metalloids / Semi-metals (B, Si, Ge, As, Sb, Te, Se)		Above 20 µg/g					
Non-metals (P, S, Cl, N, O)		Yes					
Halogens (F, Cl, Br, I)							
Rare Earth Elements (Lanthanides, Actinides)							
Inorganic species (elemental, anions, cations)							
Small organo-metallics							
Proteins							
Nanoparticles							
Low level (e.g. below 50 µg/g)							
High level (e.g. above 50 µg/g)							

8. References

International Organization for Standardization. (2017). Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability (ISO/GUIDE 35).

Appendix B. Registration form



LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY

SIM.QM-S11 / SIM.QM-P25

**Supplementary Comparison of elements in
Yerba mate (*Ilex paraguariensis*)**

Registration Form

April, 2021

**Ramiro Pérez Zambra, Romina Napoli, Elizabeth Ferreira
Montevideo-Uruguay**

1. Contact Information

Date	
Name of Institute	
Acronym	
Department/Laboratory	
NMI or DI	
Country	
Contact person/s	
e-mail	
Telephone number	
Address	
Zip Code	
Special custom requirements/documentation	

Import taxes or extra charges that could be arise during sample transportation are responsibility of the participant Institute.

2. Interest of participation

Measurand	Mass fraction range (mg/kg)	Supplementary comparison SIM.QM-S11 (Yes/No)	Pilot study SIM.QM-P25 (Yes/No)
Arsenic	0.02-1		
Cadmium	0.1-5		
Sodium	1-100		
Phosphorus	500-5000		

Please complete the questionnaire electronically and return it by email to rperez@latu.org.uy by May 31, 2021.

Appendix C. Reporting form

SIM.QM-S11&P25

General Information

Date (YYYY/MM/DD)	
Institute Name	
Acronym	
Country	
Contact person/s	
e-mail	
Analyst/s	

Results

	As (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Na (mg/kg)	P (mg/g)
Mass fraction reported				
Combined standard uncertainty (u_c)				
Coverage factor (k)				
Expanded uncertainty (U)				
Relative Expanded uncertainty (%)				

SIM.QM-S11&P25 (element)**Results**

Date of analysis (YYYY/MM/DD)		
Replicate	As (mg/kg)	Bottle Number
1		
2		
3		
4		
5		
Mean		
Standard deviation		
Relative standard deviation (%)		

Determination of moisture

Date of analysis		
Replicate	Moisture (%)	Bottle Number
1		
2		
3		
4		
5		
Mean		
Standard deviation		
Relative standard deviation (%)		

Analytical Approach

Technique	
Quantification method	
MRC Calibrant	
Source of traceability	
Sample preparation	
Instrument configuration	
Mesurement conditions	
Equation	

Quality control

MRC/MR/Spike/other	
Name and Producer	
Assigned value and uncertainty	
Results	
Acceptance Criteria	
Has the acceptance criteria been met?	

Uncertainty Budget

Parameter	Source of uncertainty	Typical value	Standard Uncertainty	Unit	Type

Combined standard uncertainty (u_c)	
Coverage factor (k)	
Expanded uncertainty (U)	
Relative Expanded uncertainty (%)	

Appendix D. NIST decision tree report –

D1 - Arsenic

NIST Decision Tree Report

Summary

Include	Laboratory	Result	Uncertainty	DegreesOfFreedom
TRUE	5	0.0528	0.0015	5
TRUE	14	0.0530	0.0010	60
TRUE	9	0.0565	0.0014	60
TRUE	8	0.0575	0.0016	60
TRUE	13	0.0576	0.0029	60
TRUE	3	0.0583	0.0022	60
TRUE	1	0.0608	0.0031	60
TRUE	2	0.0630	0.0034	60
TRUE	11	0.0700	0.0020	60
TRUE	12	0.0780	0.0030	60

Date: 2024-02-20

Version Number: 1.0.4

Type of DoE: Degrees of Equivalence Ignoring Dark Uncertainty

Random Seed: 592

Selected Procedure: Hierarchical Skew Student-Gauss

Consensus estimate: 0.057506

Standard uncertainty: 0.0025487

95% coverage interval: (0.052474, 0.062538)

Dark uncertainty (tau): 0.0034787

Tau posterior 0.025 and 0.975 quantiles: (0.00069635, 0.0094048)

Decision Tree Hypothesis test results

Cochran's test for Homogeneity:

p-value: $p < 0.001$

Q = 120.1 (Reference Distribution: Chi-Square with 9 Degrees of Freedom)

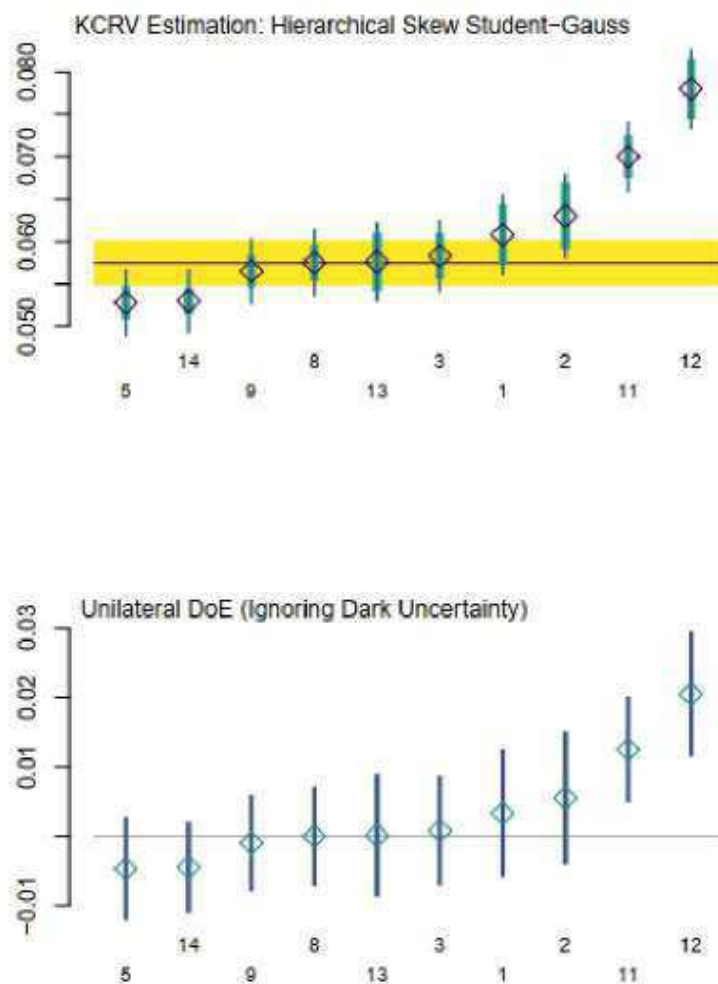
tau est. = 0.006442

tau/median(x) = 0.1112

tau/median(u) = 3.068

Shapiro-Wilk test for Normality: $p = 0.42325$ Miao-Gel-Gastwirth test of Symmetry: $p = 0.0288$

Plots



DoE Table

	Lab	DoE.x	DoE.U95	DoE.Lwr	DoE.Upr
5	5	-0.0047061	0.0071629	-0.0118690	0.0024569
14	14	-0.0045061	0.0062585	-0.0107650	0.0017525
9	9	-0.0010061	0.0060301	-0.0076362	0.0056241
8	8	-0.0000061	0.0068543	-0.0068603	0.0068482
13	13	0.0000939	0.0085574	-0.0084634	0.0086513
3	3	0.0007939	0.0075729	-0.0067789	0.0083668
1	1	0.0032939	0.0088799	-0.0055859	0.0121740
2	2	0.0054939	0.0092570	-0.0037630	0.0147510
11	11	0.0124940	0.0073626	0.0051313	0.0198570
12	12	0.0204940	0.0087381	0.0117560	0.0292320

Lab Uncertainties Table

lab	x	u	nu	ut
5	0.0528	0.0015	5	0.0037883
14	0.0530	0.0010	60	0.0036195
9	0.0565	0.0014	60	0.0037498
8	0.0575	0.0016	60	0.0038290
13	0.0570	0.0029	60	0.0045289
3	0.0583	0.0022	60	0.0041159
1	0.0608	0.0031	60	0.0046595
2	0.0630	0.0034	60	0.0048643
11	0.0700	0.0020	60	0.0040126
12	0.0780	0.0030	60	0.0045936

lab	D	uDR	UDR	LwrR	UprR	uDI	UDI	LwrI	UprI
5	-	0.0055275	0.011999	-	0.0072925	0.0032370	0.0071629	-	0.0024569
	0.0047061			0.0167050				0.0118690	
14	-	0.0052891	0.011698	-	0.0071020	0.0027574	0.0062585	-	0.0017525
	0.0045061			0.0161140				0.0107650	
9	-	0.0053674	0.011630	-	0.0106240	0.0029176	0.0060301	-	0.0056241
	0.0010061			0.0126360				0.0076362	
8	-	0.0054401	0.011837	-	0.0118310	0.0030209	0.0068543	-	0.0068482
	0.0000061			0.0118430				0.0068603	
13	0.0000939	0.0059385	0.012632	-	0.0127460	0.0038860	0.0085574	-	0.0086513
				0.0125580				0.0084634	
3	0.0007939	0.0056904	0.012177	-	0.0129710	0.0033859	0.0075729	-	0.0083668
				0.0113830				0.0067789	
1	0.0032939	0.0060718	0.012860	-	0.0161540	0.0040563	0.0088799	-	0.0121740
				0.0095666				0.0055859	
2	0.0054939	0.0062889	0.013248	-	0.0187410	0.0042692	0.0092570	-	0.0147510
				0.0077536				0.0037630	
11	0.0124940	0.0055459	0.011986	0.0065082	0.0244800	0.0032629	0.0073626	0.0051313	0.0198570
12	0.0204940	0.0060822	0.012815	0.0076792	0.0333090	0.0039723	0.0087381	0.0117560	0.0292320

MCMC Sampler Diagnostics Table (if applicable)

If one of the Bayesian models is run (Hierarchical Gauss-Gauss, Hierarchical Laplace-Gauss, or Hierarchical Skew-Student-t), then diagnostics for the MCMC sampler will be given below. As a general recommendation, if any of the R-hat values are greater than 1.05, then the sampler may not have reached equilibrium, and the "Total Number of MCMC Steps" should be increased, and the run repeated. The "Number of MCMC Warm-Up Steps" should be about half of the "Total Number of MCMC Steps." The "Effective Sample Size" (n.eff) is approximately the size of the MCMC sample that the results are based on.

	Rhat	n.eff
delta	1.003	1200
deviance	1.001	34000
lambda[1]	1.001	50000
lambda[2]	1.001	50000
lambda[3]	1.001	50000
lambda[4]	1.001	26000
lambda[5]	1.001	50000
lambda[6]	1.001	50000
lambda[7]	1.001	32000
lambda[8]	1.001	16000
lambda[9]	1.001	29000
lambda[10]	1.001	39000
mu	1.003	1600
nu	1.001	6200
sigma[1]	1.001	26000
sigma[2]	1.001	41000
sigma[3]	1.001	43000
sigma[4]	1.001	30000
sigma[5]	1.001	29000
sigma[6]	1.001	45000
sigma[7]	1.001	50000
sigma[8]	1.001	50000
sigma[9]	1.001	39000
sigma[10]	1.001	50000
tau	1.002	1800

D2 – Cadmium**NIST Decision Tree Report****Summary**

Include	Laboratory	Result	Uncertainty	DegreesOfFreedom
TRUE	6	0.7200	0.0200	238
TRUE	3	0.7280	0.0230	60
TRUE	8	0.7320	0.0110	60
TRUE	14	0.7500	0.0070	60
TRUE	5	0.7504	0.0074	5
TRUE	12	0.7600	0.0200	60
TRUE	9	0.7600	0.0130	60
TRUE	7	0.7660	0.0205	60
TRUE	13	0.7660	0.0230	60
TRUE	11	0.7950	0.0220	60
TRUE	1	0.8000	0.0421	60
TRUE	2	0.8100	0.0350	60

Date: 2024-02-20

Version Number: 1.0.4

Type of DoE: Degrees of Equivalence Ignoring Dark Uncertainty

Random Seed: 223

Selected Procedure: Adaptive Weighted Average

Consensus estimate: 0.7526

Standard uncertainty: 0.0054227

Standard uncertainty (using parametric bootstrap): 0.0056467

95% coverage interval: (0.74197, 0.76323)

95% coverage interval (using parametric bootstrap): (0.7414, 0.76379)

Dark uncertainty (tau): 0.0098293

Decision Tree Hypothesis test results:

Cochran's test for Homogeneity:

p-value: 0.13

Q = 16.25 (Reference Distribution: Chi-Square with 11 Degrees of Freedom)

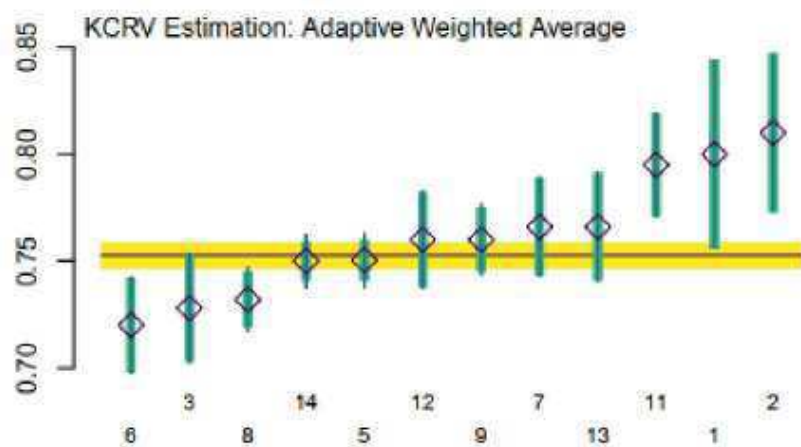
tau est. = 0.009829

tau/median(x) = 0.01293

tau/median(u) = 0.4854

Shapiro-Wilk test for Normality: p = 0.5068

Miao-Gel-Gastwirth test of Symmetry: p = 0.7278

Plots

DoE Table

	Lab	DoE.x	DoE.U95	DoE.Lwr	DoE.Upr
6	6	-0.0325970	0.037812	-0.070409	0.0052147
3	3	-0.0245970	0.044152	-0.068749	0.0195550
8	8	-0.0205970	0.019633	-0.040230	-0.0009641
14	14	-0.0025973	0.012838	-0.015435	0.0102400
5	5	-0.0021973	0.014228	-0.016425	0.0120300
12	12	0.0074027	0.037871	-0.030468	0.0452730
9	9	0.0074027	0.024291	-0.016888	0.0316940
7	7	0.0134030	0.039389	-0.025986	0.0527920
13	13	0.0134030	0.043613	-0.030210	0.0570160
11	11	0.0424030	0.041536	0.000867	0.0839380
1	1	0.0474030	0.081417	-0.034015	0.1288200
2	2	0.0574030	0.068759	-0.011357	0.1261600

Lab Uncertainties Table

lab	x	u	nu	ut
6	0.7260	0.0200	238	0.022285
3	0.7280	0.0230	60	0.025012
8	0.7320	0.0110	60	0.014752
14	0.7500	0.0070	60	0.012067
5	0.7504	0.0074	5	0.012303
12	0.7600	0.0200	60	0.022285
9	0.7600	0.0130	60	0.016298
7	0.7660	0.0205	60	0.022735
13	0.7660	0.0230	60	0.025012
11	0.7950	0.0220	60	0.024096
1	0.8000	0.0421	60	0.043232
2	0.8100	0.0350	60	0.036354

lab	D	uDR	UDR	LwrR	UprR	uDI	UDI	LwrI	UprI
6	-	0.021874	0.042966	-	0.010369	0.0192960	0.037812	-	0.0052147
	0.0325970			0.0755640				0.070409	
3	-	0.024504	0.047811	-	0.023214	0.0225050	0.044152	-	0.0195550
	0.0245970			0.0724080				0.068749	
8	-	0.014109	0.028247	-	0.007650	0.0101290	0.019633	-	-0.0009641
	0.0205970			0.0488450				0.040230	
14	-	0.011664	0.024392	-	0.021795	0.0064856	0.012838	-	0.0102400
	0.0025973			0.0269890				0.015435	
5	-	0.011838	0.024555	-	0.022357	0.0070396	0.014228	-	0.0120300
	0.0021973			0.0267520				0.016425	
12	0.0074027	0.021707	0.043030	-	0.050432	0.0191930	0.037871	-	0.0452730
				0.0356270				0.030468	
9	0.0074027	0.015784	0.031755	-	0.039157	0.0124240	0.024291	-	0.0316940
				0.0243520				0.016888	
7	0.0134030	0.022345	0.043273	-	0.056676	0.0199230	0.039389	-	0.0527920
				0.0298700				0.025986	

lab	D	nDR	UDR	LwrR	UpeR	nDI	UDI	LwrI	UpdI
13	0.0134030	0.024663	0.049088	-	0.062491	0.0223530	0.043613	-	0.0579160
				0.0356850				0.030210	
11	0.0424030	0.023791	0.047090	-	0.089492	0.0216480	0.041536	0.000867	0.0839380
				0.0046869					
1	0.0474030	0.043321	0.084112	-	0.131510	0.0419130	0.081417	-	0.1288200
				0.0367090				0.034015	
2	0.0574030	0.035835	0.071916	-	0.129320	0.0345140	0.068759	-	0.1261600
				0.0145130				0.011357	

MCMC Sampler Diagnostics Table (if applicable)

If one of the Bayesian models is run (Hierarchical Gauss-Gauss, Hierarchical Laplace-Gauss, or Hierarchical Skew-Student-t), then diagnostics for the MCMC sampler will be given below. As a general recommendation, if any of the R-hat values are greater than 1.05, then the sampler may not have reached equilibrium, and the "Total Number of MCMC Steps" should be increased, and the run repeated. The "Number of MCMC Warm-Up Steps" should be about half of the "Total Number of MCMC Steps." The "Effective Sample Size" (n.eff) is approximately the size of the MCMC sample that the results are based on.

D3 – Sodium

NIST Decision Tree Report

Summary

Include	Laboratory	Result	Uncertainty	DegreesOfFreedom
TRUE	6	27.10	0.513	238
TRUE	1	32.14	1.850	60
TRUE	12	33.10	1.050	60
TRUE	13	33.10	1.900	60
TRUE	4	33.80	0.270	18
TRUE	9	34.05	0.550	60
TRUE	3	34.10	1.200	60
FALSE	14	36.70	0.600	60
TRUE	2	37.65	2.140	60

Date: 2024-05-27

Version Number: 1.0.4

Type of DoE: Degrees of Equivalence Ignoring Dark Uncertainty

Random Seed: 602

Selected Procedure: Hierarchical Laplace-Gauss

Consensus estimate: 33.46

Standard uncertainty: 0.6635

95% coverage interval: (32.13, 34.8)

Dark uncertainty (tau): 2.179

Tau posterior 0.025 and 0.975 quantiles: (1.065,4.981)

Decision Tree Hypothesis test results

Cochran's test for Homogeneity:

p-value: $p < 0.001$

Q = 148.8 (Reference Distribution: Chi-Square with 7 Degrees of Freedom)

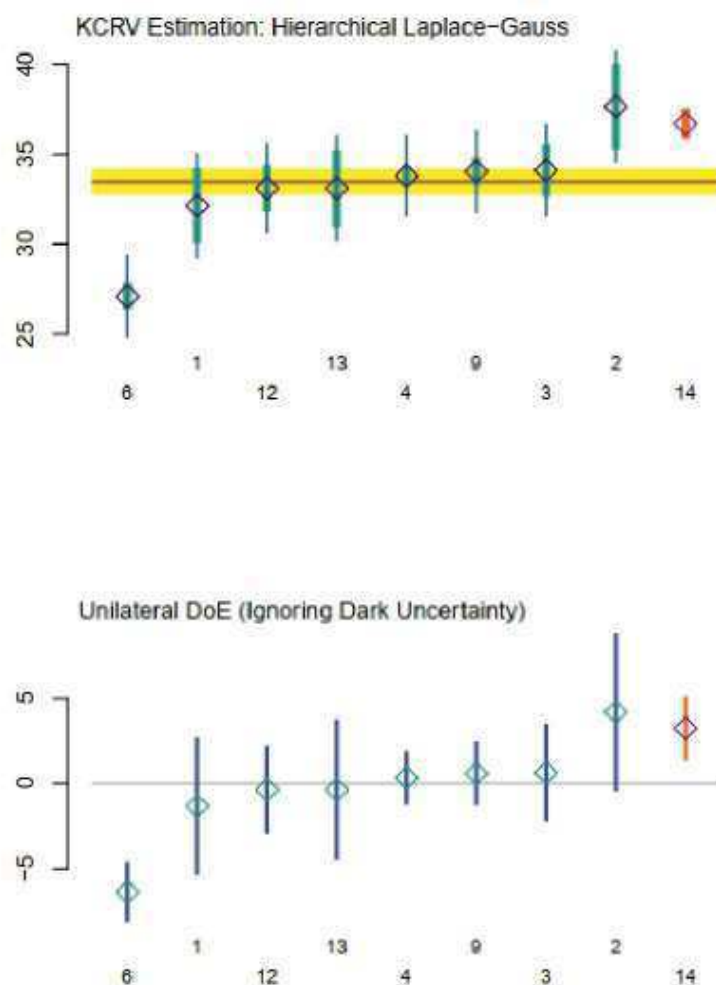
tau est. = 3.188

tau/median(x) = 0.09531

tau/median(u) = 2.834

Shapiro-Wilk test for Normality: $p = 0.0002022$ Miao-Gel-Gastwirth test of Symmetry: $p = 0.6412$

Plots



DoE Table

	Lab	DoE.x	DoE.U95	DoE.Lwr	DoE.Upr
6	6	-6.3650	1.652	-8.0170	-4.712
1	1	-1.3250	3.903	-5.2270	2.578
12	12	-0.3646	2.473	-2.8370	2.108
13	13	-0.3646	3.999	-4.3630	3.634
4	4	0.3354	1.445	-1.1100	1.781
9	9	0.5854	1.726	-1.1410	2.312
3	3	0.6354	2.729	-2.0930	3.364
14	14	3.2350	1.762	1.4740	4.997
2	2	4.1850	4.505	-0.3193	8.690

Lab Uncertainties Table

lab	x	u	mu	ut
6	27.10	0.513	238	2.239
1	32.14	1.850	60	2.859
12	33.10	1.050	60	2.419
13	33.10	1.900	60	2.891
4	33.80	0.270	18	2.196
9	34.05	0.550	60	2.248
3	34.10	1.200	60	2.488
14	36.70	0.600	60	2.260
2	37.65	2.140	60	3.054

lab	D	nDR	UDR	LwrR	UprR	nDI	UDI	LwrI	UprI
6	-6.3650	2.746	5.550	-11.910	-0.8148	0.8409	1.652	-8.0170	-4.712
1	-1.3250	3.275	6.504	-7.829	5.1800	1.9840	3.903	-5.2270	2.578
12	-0.3646	2.890	5.783	-6.148	5.4190	1.2520	2.473	-2.8370	2.108
13	-0.3646	3.312	6.556	-6.920	6.1910	2.0230	3.999	-4.3630	3.634
4	0.3354	2.698	5.455	-5.119	5.7900	0.7250	1.445	-1.1100	1.781
9	0.5854	2.727	5.522	-4.937	6.1080	0.8703	1.726	-1.1410	2.312
3	0.6354	2.943	5.848	-5.213	6.4830	1.3880	2.729	-2.0930	3.364
14	3.2350	2.747	5.543	-2.307	8.7780	0.8911	1.762	1.4740	4.997
2	4.1850	3.447	6.810	-2.625	11.0000	2.2880	4.505	-0.3193	8.690

MCMC Sampler Diagnostics Table (if applicable)

If one of the Bayesian models is run (Hierarchical Gauss-Gauss, Hierarchical Laplace-Gauss, or Hierarchical Skew-Student-t), then diagnostics for the MCMC sampler will be given below. As a general recommendation, if any of the R-hat values are greater than 1.05, then the sampler may not have reached equilibrium, and the "Total Number of MCMC Steps" should be increased, and the run repeated. The "Number of MCMC Warm-Up Steps" should be about half of the "Total Number of MCMC Steps." The "Effective Sample Size" (n_{eff}) is approximately the size of the MCMC sample that the results are based on.

	Rhat	n _{eff}
deviance	1.001	50000
lambda[1]	1.001	39000

	Rhat	n.eff
lambda[2]	1.001	18000
lambda[3]	1.001	50000
lambda[4]	1.001	50000
lambda[5]	1.001	50000
lambda[6]	1.001	50000
lambda[7]	1.001	50000
lambda[8]	1.001	44000
mu	1.001	42000
sigma[1]	1.001	50000
sigma[2]	1.001	50000
sigma[3]	1.001	50000
sigma[4]	1.001	50000
sigma[5]	1.001	38000
sigma[6]	1.001	50000
sigma[7]	1.001	50000
sigma[8]	1.001	50000
tau	1.001	50000

D4 - Phosphorus

NIST Decision Tree Report

Summary

Include	Laboratory	Result	Uncertainty	DegreesOfFreedom
FALSE	14	1.650	0.020	60
TRUE	10	1.667	0.016	60
TRUE	13	1.700	0.054	60
TRUE	9	1.735	0.028	60
TRUE	12	1.736	0.060	60
TRUE	2	1.802	0.080	60
TRUE	1	1.824	0.036	60

Date: 2025-03-21

Version Number: 1.0.4

Type of DoE: Degrees of Equivalence Ignoring Dark Uncertainty

Random Seed: 728

Selected Procedure: Hierarchical Gauss-Gauss

Consensus estimate: 1.738

Standard uncertainty: 0.02325

95% coverage interval: (1.692, 1.784)

Dark uncertainty (tau): 0.05381

Tau posterior 0.025 and 0.975 quantiles: (0.02108,0.1271)

Decision Tree Hypothesis test results

Cochran's test for Homogeneity:

p-value: 0.0016

Q = 19.46 (Reference Distribution: Chi-Square with 5 Degrees of Freedom)

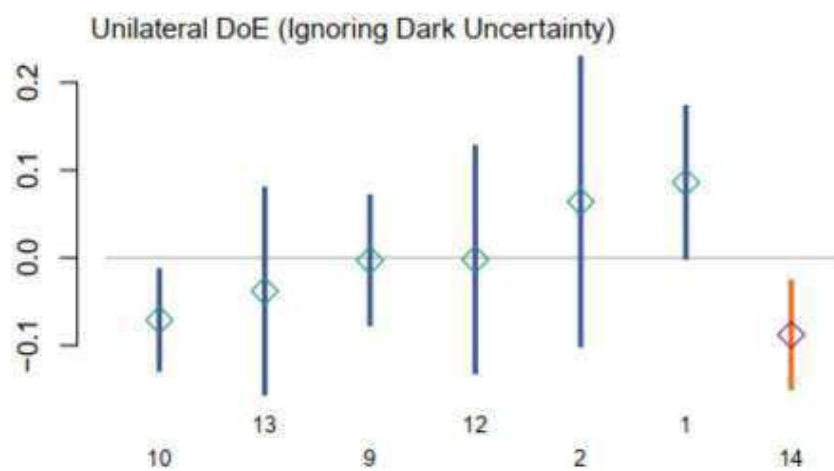
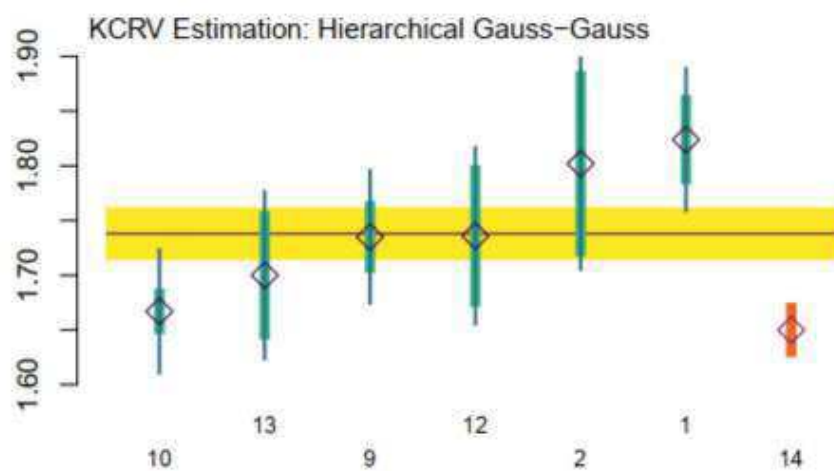
tau est. = 0.05938

tau/median(x) = 0.03422

tau/median(u) = 1.32

Shapiro-Wilk test for Normality: p = 0.3889

Miao-Gel-Gastwirth test of Symmetry: p = 0.3098



DoE Table

	Lab	DoE.x	DoE.U95	DoE.Lwr	DoE.Upr
14	14	-0.087960	0.06016	-0.1481000	-0.02780
10	10	-0.070960	0.05614	-0.1271000	-0.01482
13	13	-0.037960	0.11640	-0.1544000	0.07846
9	9	-0.002964	0.07235	-0.0753100	0.06939
12	12	-0.001964	0.12790	-0.1299000	0.12590
2	2	0.064040	0.16350	-0.0994200	0.22750
1	1	0.086040	0.08546	0.0005809	0.17150

Lab Uncertainties Table

lab	x	u	ni	ut
14	1.650	0.020	60	0.05741
10	1.667	0.016	60	0.05614
13	1.700	0.054	60	0.07623
9	1.735	0.028	60	0.06066
12	1.736	0.060	60	0.08060
2	1.802	0.080	60	0.09641
1	1.824	0.036	60	0.06474

lab	D	uDR	UDR	LwrR	UprR	uDI	UDI	LwrI	UprI
14	-0.087960	0.07224	0.1453	-0.23330	0.05736	0.03061	0.06016	-0.1481000	-0.02780
10	-0.070960	0.07128	0.1437	-0.21470	0.07276	0.02850	0.05614	-0.1271000	-0.01482
13	-0.037960	0.08772	0.1730	-0.21100	0.13510	0.05930	0.11640	-0.1544000	0.07846
9	-0.002964	0.07482	0.1491	-0.15210	0.14620	0.03674	0.07235	-0.0753100	0.06939
12	-0.001964	0.09143	0.1811	-0.18310	0.17910	0.06498	0.12790	-0.1299000	0.12590
2	0.064040	0.10570	0.2076	-0.14360	0.27170	0.08367	0.16350	-0.0994200	0.22750
1	0.086040	0.07774	0.1548	-0.06872	0.24080	0.04339	0.08546	0.0005809	0.17150

MCMC Sampler Diagnostics Table (if applicable)

If one of the Bayesian models is run (Hierarchical Gauss-Gauss, Hierarchical Laplace-Gauss, or Hierarchical Skew-Student-t), then diagnostics for the MCMC sampler will be given below. As a general recommendation, if any of the R-hat values are greater than 1.05, then the sampler may not have reached equilibrium, and the "Total Number of MCMC Steps" should be increased, and the run repeated. The "Number of MCMC Warm-Up Steps" should be about half of the "Total Number of MCMC Steps." The "Effective Sample Size" (n.eff) is approximately the size of the MCMC sample that the results are based on.