



PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES
COMITÉ DU CODEX SUR LES MÉTHODES D'ANALYSE ET D'ÉCHANTILLONNAGE

Quarante-troisième session

Budapest (Hongrie)

13 – 18 mai 2024

CRITÈRES DE PERFORMANCE NUMÉRIQUES POUR LA DÉTERMINATION DES IONS NITRATE ET NITRITE DANS CERTAINES MATRICES ALIMENTAIRES

(Rédigé par l'Australie et les États-Unis d'Amérique)

CONTEXTE

1. Lors de sa 51^e session (2019), le Comité sur les additifs alimentaires (CCFA) est convenu d'adopter une approche de gestion des risques qui établirait à la fois les niveaux entrants et les niveaux de résidus pour les nitrates et les nitrites dans la *Norme générale pour les additifs alimentaires* (NGAA) (CXS 192-1995). Lors de sa 52^e session (2021), le CCFA a demandé au Comité du Codex sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage (CCMAS):
 - i. d'établir des critères pour la détection des ions nitrate et nitrite dans une variété de matrices alimentaires, en particulier les produits laitiers (fromage), la viande et les fruits de mer; et
 - ii. de fournir des informations sur les méthodes de détection disponibles qui répondent aux critères établis et d'indiquer en outre si la méthode est capable de détecter à la fois les ions nitrate et nitrite et, dans l'affirmative, si chaque ion peut être détecté séparément ou seulement en combinaison;
2. Suite à cette demande, le Comité, lors de sa 42^e session (2023), a noté qu'un examen plus approfondi était nécessaire pour apporter une réponse au CCFA. Pendant cette même session le Comité a décidé de constituer un groupe de travail électronique présidé par les États-Unis d'Amérique, travaillant en anglais, avec le mandat suivant:
 - établir des critères de performance numériques pour la détermination des ions nitrate et nitrite dans les matrices alimentaires énumérées dans l'annexe 2 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7;
 - examiner les méthodes dans l'annexe 1 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7 et déterminer si ces méthodes répondent aux critères de performance numérique établis pour les matrices dans l'annexe 2 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7;
 - examiner si les méthodes permettent de déterminer à la fois les ions nitrate et nitrite et, dans l'affirmative, si chaque ion peut être détecté séparément ou seulement en combinaison;
 - examiner si les différents systèmes de détection (c'est-à-dire séparément ou en combinaison) peuvent avoir une incidence sur la précision et l'exactitude des méthodes.
3. Finalement, ce groupe de travail électronique n'a pas été constitué. Cependant, l'Australie et les États-Unis d'Amérique ont fait des progrès dans les travaux conformément au mandat mentionné au paragraphe 2.
4. Le présent rapport est donc basé sur les débats de la quarante-deuxième session du Comité (2023). Le rapport comprend en outre les appendices suivants:
 - i. Appendice 1: Dispositions pour les nitrates (INS 251, 252) et les nitrites (INS 249, 250) dans le processus par étapes ou adoptées (niveaux d'utilisation entrants et résiduels) sur la base de l'annexe 2 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7, y compris des informations sur les

niveaux d'utilisation résiduels les plus bas proposés¹ pour les dispositions représentatives dans les produits laitiers (fromage), la viande et les fruits de mer, et mettant en exergue les sections pertinentes de la *Norme générale pour les additifs alimentaires* (CXS 192-1995), notamment la page 183; et

- ii. Appendice 2: Résumé des observations sur les méthodes d'essai disponibles pour les nitrates et les nitrites figurant dans annexe 1 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7.

DÉBAT

Établir des critères de performance numériques pour la détermination des ions nitrate et nitrite dans les matrices alimentaires énumérées dans l'annexe 2 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7

5. La «LM résiduelle (mg/kg)» dans l'annexe 2 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7 fournit une LQ proposée pour les méthodes et non la «LM» que le CCMAS exigerait pour l'élaboration des critères de performance des méthodes. La seule sous-catégorie (produit) répertoriée avec une disposition LM adoptée dans la norme CXS 192-1995 était «01.6.2.1 (Fromage affiné, comprenant la croûte)». Pour obtenir les autres valeurs ML potentielles de sous-catégories, notamment celles proposées dans les « Observations soumises concernant l'appendice 5 de la NGAA: Les dispositions pour les nitrates (INS 251, 252) et les nitrites (INS 249, 250) dans le processus par étapes ou adoptées (niveaux d'utilisation d'entrée et résiduels) (appendice 5, CX/FA 21/52/7) ont été utilisées. La LM potentielle et les critères de performance correspondants ont été présentés à l'appendice 1 ci-dessous, en notant qu'il pourrait y avoir un numéro de sous-catégorie mal attribué pour le «fromage fondu».
6. Pour répondre aux exigences formulées par le CCFA, une méthode devra répondre à tous les critères de performance de méthode spécifiés (y compris la LQ), et elle devra également avoir une LQ inférieure à la «LM résiduelle (mg/kg)» la plus basse dans l'annexe 2 de l'appendice 5 du CX/FA. 21/52/7 pour la matrice alimentaire concernée.

Examiner les méthodes dans l'annexe 1 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7 et déterminer si ces méthodes répondent aux critères de performance numérique établis pour les matrices dans l'annexe 2 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7

7. Les méthodes répertoriées dans l'annexe 1 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7 ont été rassemblées avec des données de performance librement disponibles et ont également été répertoriées ci-dessous dans l'appendice 2 (à l'exception de l'UE – «Méthodes pour la détermination quantitative du nitrite seul» qui comprenait 16 autres éléments de méthode suggérés). Appendice 2 couvre 59 propositions de méthodes provenant de 10 pays membres, ou organisations membres, ou organisme de normalisation, avec quelques répétitions (18 cas où la soumission de la méthode a été répétée par un autre membre ou organisation).
8. Lorsque les soumissions de méthodes n'incluaient pas d'aliments dans leur champ d'application ou ne constituaient qu'un résumé des méthodes, elles étaient considérées comme «ne pouvant pas faire l'objet d'un examen plus approfondi» (dans 7 cas). Il restait donc 34 méthodes à examiner par rapport aux critères de performance de la méthode (dont 14 étaient des méthodes normalisées par l'AOAC, le NMKL, l'ISO, la FIL ou l'EN) pour différents domaines d'application d'aliments, soit individuellement ou dans certains cas, en combinaisons des produits suivants: viande et produits carnés, préparations pour les nourissons, légumes et produits végétaux, lait et produits laitiers, fruits et mollusques écaillés. Il convient de noter qu'une seule méthode incluait les «poissons et produits de la pêche» dans le champ d'application et, dans ce cas, les «mollusques écaillés (moules et palourdes)». De nombreuses méthodes impliquaient la « colorimétrie/réaction de Griess » {certaines automatisées avec analyse en flux segmenté (SFA) ou analyse par injection de flux (FIA)} et mesuraient «NO₂ et NO_x (NO₃ par soustraction)» ; tandis qu'un autre groupe plus important incluait la « HPLC » avec divers détecteurs et mesurait « NO₂ et NO₃ séparément».
9. Il convient de noter que seul un nombre limité de méthodes publiées avant 2005 fournissent un ensemble complet de données de validation permettant une comparaison avec les critères de performance de la méthode. Les méthodes publiées entre 1995 et 2005 avaient tendance à fournir soit des données LD, soit des données LQ, ainsi que des données de précision. Avant 1995, la publication des données de validation était rare et les méthodes normalisées à partir de 2010 tendent à inclure des

¹ L'utilisation du terme « niveau résiduel le plus bas proposé » suggère une méthode d'une LQ souhaitée, et non pas une limite de spécification maximale.

données d'essais interlaboratoires. Les articles de recherche sur les méthodes publiés ne fournissent généralement qu'une validation par un seul laboratoire, mais peuvent comparer les résultats avec des méthodes standardisées ou utiliser un matériau de référence certifié dans leur validation.

10. Au sujet des aliments dans lesquels les nitrites/nitrates sont utilisés comme «additifs», des efforts ont été déployés pour réduire les niveaux de «résidus» dans les aliments là où cela n'a pas augmenté le signalement du botulisme. Cela a conduit à un plus grand nombre d'études sur le niveau endogène de divers aliments et à des méthodes de limite de quantification (LQ) plus basse en général. Lorsqu'une méthode normalisée répondait très probablement aux critères et qu'elle a fait l'objet d'essais interlaboratoires, cette méthode a été répertoriée de préférence par rapport à une «méthode validée par un seul laboratoire». Il pourrait donc être utile de compléter la liste des méthodes par des méthodes publiées plus récemment, étant donné que les méthodes les plus récemment publiées datent de 2018 (c'est-à-dire d'il y a 5 à 6 ans) et que l'on espère qu'un plus grand nombre de méthodes normalisées seront mises à jour.
11. Il est intéressant de noter que l'article Zhong et al 2021² indique que leurs critères d'extraction de données appliqués étaient les suivants: a) la méthode spectrophotométrique basée sur la réaction de Griess a été utilisée comme méthode de référence, et b) la fiabilité et l'applicabilité des méthodes classées comme l'essai de Griess (par exemple, la méthode AOAC 993.03) > méthodes chromatographiques (chromatographie ionique et autre chromatographie liquide en phase inverse (LC), LC-MS, chromatographie en phase gazeuse (GC), GC-MS) > méthodes spectrofluorimétriques > électrophorèse capillaire > chimiluminescence [Wang et al 2017³]. De même, ils ne répertorient que moins de 10 références pour les nitrates et les nitrites en mg/kg dans la catégorie «Poissons et produits de la mer». Pour voir comment des méthodes avec des LD/LQ réduite pourraient être utilisées, une étude de Lacumin et al de 2019 visant à déterminer le niveau de concentration «naturelle» de nitrites et de nitrates dans la viande crue, le sel et le sugna (graisse molle de porc) utilisés pour produire le jambon cru sec San Daniele (SDDCH) et dans le SDDCH (PDO) pourra servir de référence. Le terme «naturel» signifie que les deux composés n'ont pas été délibérément ajoutés par les producteurs lors de la production du jambon. Les données obtenues ont mis en évidence que la concentration en nitrite et nitrate dans le SDDCH PDO doit être considérée comme naturelle lorsqu'elle est respectivement inférieure à 4 et 22 mg/kg du produit affiné, quelle que soit la durée d'affinage (14 à 19 mois).
12. Les méthodes qui répondraient « probablement » ou « éventuellement » aux critères ont été incluses dans l'appendice 1 ci-dessous, mais quelques travaux supplémentaires seraient encore nécessaires pour trouver une source pour les données de validation supplémentaires. «Nitrite 09.3.3 (substituts de saumon, caviar et autres produits à base d'œufs de poisson)» avait une LD/LQ très faible, ce qui pourrait être obtenu avec des méthodologies plus récentes, mais probablement pas avec les méthodes «standardisées» existantes.

Examiner si les méthodes permettent de déterminer à la fois les ions nitrate et nitrite et, dans l'affirmative, si chaque ion peut être détecté séparément ou seulement en combinaison

13. L'appendice 2 répertorie les 5 variantes de «NO₂ et NO₃ séparément ou en combinaison»:
 - NO₂ et NO₃ séparément,
 - NO_x seul,
 - NO₂ seul,
 - NO₃ seul,
 - NO₂ et NO_x (NO₃ par soustraction).
14. Comme indiqué ci-dessus, les méthodes utilisant la «HPLC» avec divers détecteurs et l'électrophorèse capillaire (CE) mesurent généralement «NO₂ et NO₃ séparément».
15. Certaines méthodes utilisant la « colorimétrie/réaction de Griess » ont été automatisées avec une analyse en flux segmenté (SFA) ou une analyse par injection de flux (FIA) pour mesurer le « NO₂ », et auraient ensuite une prise d'essai distincte pour subir une réduction (Cd ou V(III), ou colonnes Zn) pour mesurer les NO_x (sous forme de NO₂), la concentration en nitrate étant calculée par soustraction et l'application d'un facteur. Dans d'autres cas, le niveau de nitrite était supposé être faible et la prise d'essai subirait donc une réduction, mesurant les NO_x mais les rapportant en tant que concentration de nitrate.

Examiner si les différents systèmes de détection (c'est-à-dire séparément ou en combinaison) peuvent avoir une incidence sur la précision et l'exactitude des méthodes.

² Zhong et al 2021 Develop. Food Comp Database Assessing NO₃ & NO₂ Intake from Animal-based Foods Mol. Nutr. Food Res. 2022, 66, 2100272

³ Wang et al 2017 Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate-A review Talanta 2017, 165

16. Les méthodes permettant de déterminer les nitrates et les nitrites dans une gamme de matrices (produits) pourraient ne plus être pertinentes si les niveaux maximaux autorisés étaient considérablement réduits par rapport à ce qui était exigé historiquement. La plupart des méthodes normalisées ont été publiées en 2006 ou avant, à deux exceptions près NMKL No. 194:2013 et EN 12014-2:2018, de sorte que la majorité ont été élaborées avant les récentes avancées technologiques dans les instruments disponibles dans le commerce (y compris ceux de la FIA/SFA, HPLC et CE au cours de cette période) et des améliorations soutenant les essais interlaboratoires et le reporting des performances des méthodes. Nous pourrions nous attendre à une amélioration de la LD/LQ si ces normes étaient mises à jour avec des instruments plus récents et des essais interlaboratoires. Cependant, il convient également de noter qu'à mesure que des ML et, par conséquent, des LD/LQ plus faibles sont recherchées, les diverses interférences deviendront plus évidentes (et chaque technique les produira soit de la matrice, des produits chimiques ou de l'équipement impliqué) et pourrait nécessiter des étapes supplémentaires ou des techniques hybrides pour atténuer les interférences. Il est également possible d'accepter une technique de compromis qui ne serait pas la plus sensible, mais qui donnerait des résultats satisfaisants, serait pratique et applicable dans des conditions normales de laboratoire, pour tous les produits ou la plupart d'entre eux.
17. Par exemple, il a été constaté que l'analyse HPLC et l'analyse de la réaction de Griess pouvaient donner des résultats similaires pour les solutions aqueuses. Cependant, les graisses/protéines réduiraient l'efficacité d'une colonne HPLC et de la cellule de spectrométrie pour la colorimétrie, mais alors que la déprotéinisation de l'extrait de la solution de Carrez fonctionnerait bien avec les analyses basées sur la réaction de Griess, la solution de Carrez n'a pas été recommandée comme solution clarifiante pour les méthodes de chromatographie par échange d'ions. Les paramètres de la réaction de Griess ont été bien étudiés par Mohamed et al 2008⁴. Merino et al. 2000⁵ ont signalé que la solution de Carrez n'était pas recommandée comme solution clarifiante pour les méthodes de chromatographie ionique et ont également étudié le taux d'épuisement des pics de nitrite et de nitrate dans le jambon. L'étude a montré que le pH de la matrice au moment de l'ajout de nitrite/nitrate avait la plus grande influence sur la stabilité de ces ions; en conclusion, plus le pH est élevé, meilleure est la récupération.
18. L'étude Croitoru 2012⁶ a mis en évidence des interférences potentielles dans la quantification de la réaction de Griess et pas seulement dues à la couleur rouge des fruits et légumes, par ex. betterave rouge, montrant qu'il existait des substances capables d'imiter la réaction de Griess, et ainsi elle ne pouvait plus être considérée comme spécifique de l'anion nitrite. Avec la formation de substances autres que le colorant azoïque attendu les mesures spectrophotométriques devaient être utilisées avec précaution, cependant l'idée de suggérer une séparation chromatographique résoudrait les problèmes posés par de telles interférences (qui seraient plus apparentes à des concentrations plus faibles).
19. Pour les méthodes de spectrophotométrie utilisant la réaction de Griess pour les nitrites et une réaction de Griess parallèle avec réduction de Cd, V(III) ou Zn pour quantifier les NO_x ainsi que la concentration de nitrates par soustraction, bien que bien établies, les résultats étaient plus précis dans les cas où les déterminations des nitrites et des NO_x ont été réalisés en parallèle avec une instrumentation automatisée FIA/SFA pour la stabilité et la reproductibilité et avec une colonne de réduction en ligne. Pour les méthodes ISO 6635 et sur colonne cadmium (Cd), il a été démontré que le fer, le cuivre, le chlorure ou d'autres métaux en concentration supérieure à 1 mg L⁻¹ ou une matière organique dans un échantillon pouvaient diminuer l'efficacité de conversion en recouvrant la surface active de l'élément réducteur. Le cadmium a été classé comme agent cancérigène suspecté (Carranzo, 2012⁷; Ferreira et al., 1998⁸), mais ce risque pourrait être atténué (mais pas éliminé) grâce aux colonnes de réduction en ligne. On pourrait également s'attendre à ce que l'incertitude de mesure relative pour les concentrations de nitrite et de NO_x à mi-parcours soit similaire, mais que, par soustraction, les concentrations de nitrate à mi-parcours calculées aient une incertitude standard combinée plus élevée.
20. Dans la réaction de Griess avec les méthodes sur colonne Cd, la réaction de réduction dépendrait principalement du transport massif de nitrate vers la surface Cd/Cu; l'efficacité réductrice du mélange Cd/Cu doit être soigneusement vérifiée. Lorsque les solutions étaient trop alcalines ou que la surface

⁴ Mohamed et al. 2008 Modification of AOAC Method 973.31 for Determination of Nitrite in Cured Meats JAOACI VOL. 91, NO. 4, p820-7

⁵ MERINO et al. 2000 LC Detn of Residual Nitrite-Nitrate in Foods, NMKL Collaborative Study_JAOACI Vol. 83, NO. 2, 2000

⁶ Croitoru MD, 2012. Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UVNIS technique. Journal of Chromatography B, 911, 154-161

⁷ Carranzo IV (2012) Standard Methods for examination of water and wastewater, Anales de hidrología médica. Universidad Complutense de Madrid, p 185

⁸ Ferreira AM, Rangel AO, Lima JL (1998) Flow injection systems for elemental soil analysis determinations. Commun Soil Sci Plant Anal 29:327-360

métallique était trop inactive, seule une réduction partielle du nitrate en nitrite avait lieu. Lorsque les solutions étaient trop acides ou contenaient des métaux très électronégatifs, les nitrates pouvaient être réduits davantage qu'en nitrites. Les deux situations entraîneraient une conversion incomplète du nitrate en nitrite et une diminution conséquente de la récupération (Cruz et Martins Loução, 2002⁹, Beheshti et al. 2023¹⁰).

21. Beheshti et al. 2023 ont comparé trois méthodes, la BS EN 12014-2 (HPLC UV/Vis), l'ISO 6635 et la méthode sur colonne Cd, pour mesurer les nitrates dans 11 légumes importants avec une large plage de niveaux de nitrate allant de faible (comme la tomate et la pastèque) à très élevé (comme la laitue, les épinards et le céleri). Les avantages et les limites de chaque technique ont été évalués sous différents aspects.
22. Pour la chromatographie ionique (IC) à détection conductométrique, il était difficile de mesurer de faibles concentrations de nitrite en présence de chlorure en vrac (Butt et al 2001¹¹). Diverses techniques étaient disponibles pour atténuer ces problèmes, par exemple Aggrawal et al 2020¹² ont soumis les extraits d'échantillons à une série d'étapes de nettoyage avant l'analyse par un système IC avec une cartouche OnGuard II RP de Dionex éliminant les substances hydrophobes telles que les hydrocarbures aromatiques des échantillons. La cartouche Dionex OnGuard II Ag/H superpose les résines des cartouches Dionex OnGuard II Ag et Dionex OnGuard II H. Une cartouche Dionex OnGuard II Ag éliminerait le chlorure, le bromure et l'iodure des échantillons, tandis que dans cette application, une cartouche Dionex OnGuard II H piégerait tout l'argent qui aurait pu s'échapper de la cartouche Ag ainsi que d'autres cations trouvés dans l'échantillon. La méthode a montré une bonne précision avec des RSD <0,2% et <5% (n=9) pour le temps de rétention et la surface du pic, respectivement. Les taux de récupération de l'homogénéat de viande et de l'échantillon d'épinards en bouillie étaient compris entre 89 et 100%.
23. Coviello et al 2020¹³ ont fait un bon résumé en indiquant qu'au cours des 15 dernières années, de nombreuses méthodes ont été rapportées dans la littérature pour la séparation et la détection du nitrite et (ou) du nitrate sur la base de techniques spectrophotométriques, chimiluminescentes, électrochimiques, chromatographiques, électrophorétiques capillaires, spectrofluorimétriques et électrochimiluminescentes. Cependant, les méthodes spectrophotométriques sont sujettes à diverses interférences et à un manque de sélectivité. En ce qui concerne les méthodes chromatographiques, la chromatographie en phase gazeuse nécessiterait une réaction de dérivatisation des nitrites et des nitrates, et la chromatographie en phase liquide cacherait le risque d'oxydation des nitrites, principalement lorsqu'un milieu acide est utilisé. La chromatographie ionique (IC) couplée à la détection de conductivité (CD) offrirait une bonne reproductibilité ainsi qu'une sensibilité et une sélectivité élevées. Il s'agit d'un résultat très différent des critères d'extraction de données utilisés par Zhong et al. 2021¹.

CONCLUSION

24. Il convient de rappeler que le CCMAS fournit des critères de performance de méthodes et que toute méthode validée susceptible de répondre à ces critères avec les produits et les dispositions peut être utilisée.
25. Comme indiqué ci-dessus, certaines méthodes normalisées pourraient répondre aux critères (bien que des données de validation supplémentaires soient nécessaires). Toutefois, grâce à des mises à jour des techniques existantes, le taux de conformité des méthodes normalisées pourrait être augmenté de manière significative. Il serait difficile, mais pas nécessairement irréalisable, d'essayer de mettre au point un système d'analyse unique pour déterminer séparément les nitrates et les nitrites et de répondre ainsi à tous les besoins en terme de produits et de dispositions.
26. De même, avec une gamme appropriée de matériaux de référence certifiés et d'autres mesures de QA et de QC, ainsi qu'un nettoyage approprié des extraits, les schémas de détermination basés sur l'IC/CD, la spectroscopie avec FIA/SFA automatisé ou CE pourraient fournir des techniques disponibles et pratiques pour le contrôle de routine avec des LD/LQ, la précision et l'exactitude requises.

⁹ Cruz C, Martins Loução M (2002) Comparison of methodologies for nitrate determination in plants and soils. *J Plant Nutr* 25:1185–1211

¹⁰ Beheshti et al. 2023 Comparison of three methods for determination of nitrate content in different vegetables. Préimpression disponible sur <https://www.researchsquare.com/article/rs-3071274/v1>

¹¹ Butt et al. 2001, Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography *Talanta* 55 (4) p789-797

¹² Aggrawal et al. 2020 Simultaneous detn nitrate and nitrite in spinach and meat by ion chromatography Thermo Fisher Appl. note an73450-en

¹³ Coviello et al. 2020 Valid. NO2-NO3 Detn in Meat Foods for Infants by IC with Cond. Detn_Foods. 2020 Sep 4;9(9)_1238

RECOMMANDATION

27. Le Comité est invité à:

- i. examiner les résultats mis en évidence dans le présent rapport pendant ses débats sur la réponse à donner aux demandes du CCFA;
 - a) décider s'il convient d'approuver les critères de performance numériques, y compris les exemples de méthodes, figurant à l'appendice 1 dans la réponse au CCFA;
 - b) décider si des travaux supplémentaires sont nécessaires pour obtenir et examiner les données de validation des méthodes figurant à l'appendice 1 en tant qu' «exemples de méthodes applicables répondant aux critères»;
 - c) reconduire le groupe de travail électronique pour examiner plus en détail les méthodes dans l'appendice 2 et déterminer si les méthodes sont appropriées et si elles respectent ou dépassent les critères de performance numériques.

APPENDICE I

Informations à partir de l'appendice 2 sur les niveaux résiduels les plus bas proposés pour les dispositions représentatives dans les produits laitiers (fromage), la viande et les fruits de mer, telles que fournies par les membres du groupe de travail électronique du CCFA sur la *Norme générale pour les additifs alimentaires* en réponse aux demandes d'observations concernant la première et la deuxième lettre circulaire, plus des critères de performance de la méthode basés sur les limites maximales adoptées ou les LM proposée dans l'appendice 5 de la NGAA dans le processus par étapes.

Additif alimentaire	Sous-catégorie pour laquelle une valeur a été fournie	LM résiduelle (mg/kg)	Notes	Limites maximales adoptées (CXS 192-1995) ou LM proposée par la NGAA App.5 : Dispositions pour les nitrates et les nitrites dans le processus par étapes ou adoptées.	Sur la base des limites maximales adoptées (CXS 192-1995) ou des limites maximales proposées par la NGAA					
					Plage d'application minimale (mg/kg)	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	Précision (RSD _R (%))	Récupération (%)	Exemples de méthodes applicables répondant aux critères
01.6 (Cheese and analogues)										
Nitrate	01.6.2.1 (Ripened cheese, includes rind)	7	As NO ₃	35 mg/kg as residual NO ₃ ion.	25.2 - 44.8	3.5	7	18.7	80 – 110	Most likely ISO 14673-3 IDF 189-3 ; possibly ISO 14673-2 IDF 189-2 , and Iammarino et al. 2013 (Note 2)
Nitrite	01.6.4 (Processed cheese) <i>*(see note 1)</i>	2	As NO ₂	<u>20 mg/kg as residual NO₂ ion.</u>	13.9 - 26.1	2	4	18.4	80 – 110	Most likely ISO 14673-3 IDF 189-3 ; possibly ISO 14673-2 IDF 189-2 , and Iammarino et al. 2013 (Note 2)
08.0 (Meat and meat products, including poultry and game)										
Nitrate	Same residual proposed in multiple food categories including 08.2.1.1 (Cured (including salted) non-heat treated processed meat, poultry, and game products in whole pieces or cuts)	7	As NO ₃	<u>1600 mg/kg as residual NO₃ ion.</u>	1347 - 1853	160	320	10.5	95 – 105	Most likely EN 12014-3 2005 ; possibly Siu et al 1998 ; Iammarino et al. 2013 or NMKL No.194:2013 (Note 2: check precision & recoveries).
Nitrite	08.2.1.3 (Fermented non-heat treated processed meat, poultry, and game products in whole pieces or cuts)	33	As NO ₂	<u>130 mg/kg as residual NO₂ ion.</u>	100 - 160	13	26	15.4	90 – 107	Most likely EN 12014-3 2005 ; possibly Siu et al 1998 ; Iammarino et al. 2013 or NMKL No.194:2013 (Note 2:

										check precision & recoveries).
09.0 (Fish and fish products, including molluscs, crustaceans, and echinoderms)										
Nitrate		None reported								
Nitrite	09.3.3 (Salmon substitutes, caviar, and other fish roe products)	4.4	As NO ₂	<u>5 mg/kg as residual NO₂ ion.</u>	3.1 - 6.9	0.5	1.0	25.1	80 – 110	Possibly Iammarino et al. 2013 (Note 2)

Note 1: Dans le point ci-dessus, la sous-catégorie# ne correspond pas à la description de l'appendice 2, car la catégorie d'aliments n° 01.6.1 est "fromage non affiné", tandis que la catégorie d'aliments n° 01.6.4 est "fromage fondu". Ni le "fromage non affiné" ni le "fromage fondu" n'ont de spécification adoptée pour le "nitrite (en tant que NO₂)" dans la norme CXS 192-1995 révision 2021.

Note 2: Ceci exige un "article complet", car les informations en "libre accès" ne fournissent pas suffisamment de données de validation.

APPENDICE II

Pour examen : méthodes figurant dans l'annexe 1 de l'appendice 5 du document CX/FA 21/52/7, avec les données de validation actuellement disponibles.

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
1	Australia	QIS 12641 (based on Kirk, R.S. and R. Sawyer, "Pearson's Composition and Analysis of Food". 9 th Edition, Longman, New York, 1991	?						
2	Australia	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - 4110 B.	Ion Chromat. with Chemical Suppression of Eluent Conductivity	Water / Wastewater Water (not suitable for further review)	NO ₂ & NO ₃ individually				
3	Australia	based on AOAC 973.31 see Chile Line 10.							
4	Brazil	NMKL 165 (nitrites and nitrates) 2000 Ed.	10 g sample + 0.5 g activated charcoal + 5 mL saturated borax + 50 mL water (80°C), placed in a boiling water bath 15 min extrn. With IC-UV. Nitrite and/or nitrate in foodstuffs by ion chromatography.	meat and meat products, baby food, vegetables, and cheese.	NO ₂ & NO ₃ individually	1 mg/kg (NO ₂); 10 mg/kg NO ₃ (Merino et al. 2000)	5 and 25 mg/kg for nitrite and nitrate ions, respectively	RSDR % 5.8 - 27.7 Nitrite, 5.6 - 21.1 Nitrate.	96–108% and 96–107% recovery for Nitrite and nitrate ions respectively
5	Brazil	NMKL 194 (nitrites and nitrates). See EU line 50.							
6	Brazil	ISO 2918 (nitrites). See EU line 35.							
7	Brazil	ISO 3091 (nitrates)	Extraction of a test portion with hot water, precipitation of the proteins and filtration. Reduction of the extracted nitrates to nitrite by metallic cadmium. Development of a red colour by addition of sulphanilamide and N-I - naphthylethylenediamine dihydrochloride to the filtrate and photometric measurement at 538 nm.	meat and meat products	NO _x only. Requires ISO 2918 determination for NO ₂ subtraction and calculation of NO ₃ .			The difference between the results of two determinations carried out simultaneously or in rapid succession, by the same analyst, shall not be greater than	

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
								10 % of the mean value.	
8	Chile	Wootton M, Kok SH, Buckle KA (2006) Determination of nitrite and nitrate levels in meat and vegetable products by high performance liquid chromatography. J Sci Food Agric 36:297-304	A range of fresh and processed meat and vegetable products was analysed by HPLC for nitrite and nitrate contents.	vegetable products and most meats, provided satisfactory results, but some meat products subject to matrix interference.	NO2 & NO3 individually				
9	Chile	McMullen SE, Casanova JA, Gross LK, Frank J, Schenck FJ (2005) Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in vegetable and fruit baby foods. J AOAC Int 88:1793-1796	Nitrate and nitrite were separated on a hydroxide-selective anion exchange column using online electrolytically generated high-purity hydroxide eluant and detected using suppressed conductivity detection.	fruit and vegetable baby foods.	NO2 & NO3 individually				
10	Chile	AOAC Method 973 (should be 973.31)	5g meat/40ml 80°C water to 500mL extn. - Colorimetry (NED - Griess reaction).	Cured meat, including in canned corned beef and luncheon meat	NO ₂ only.	1.13 mg/kg Est. (Mohamed et al. 2008)	3.77 mg/kg Est. (Mohamed et al. 2008)	NA	78- 85% (Mohamed et al. 2008)
11	Chile	Merino et al (2000) JAOACI Vol. 83, No.2, validation of NMKL 165 (nitrites and nitrates) see Brazil line 4.							
12	Chile	Wootton et al (2006) see Chile Line 8.							
13	Chile	Pandurangappa et al. (2011) Quantification of Nitrite/Nitrate in Food Stuff Samples Using 2-Aminobenzoic Acid as a New Amine in Diazocoupling Reaction. Food Anal. Methods (2011) 4:90-99.	The proposed method is based on the diazotization of nitrite with 2-aminobenzoic acid and its subsequent coupling with N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in aqueous medium to form an azo dye.	vegetable, fruit juice, and milk powder	NO2 & NOX (NO3 by subtraction)	0.056, 0.062, 0.078 µg ml ⁻¹ in Tomato, Orange and Moosambi respectively (values may be in food juice diluted in water).	1.07, 1.80, 2.30 µg ml ⁻¹ in Tomato, Orange and Moosambi respectively. (LOD & LOQ calculated as per APHA?)	RSD = 1.16-2.02%	99.3 – 103% spike recovery
14	Chile	Chou et al (2003) A High Performance Liquid Chromatography Method for	Fifty mL of deionized (DI) water was added to the well-homogenized sample weighed 1g in a 100 mL	vegetables	NO2 & NO3 individually	5 mg/kg	NA	Repeated trials all	The recoveries of nitrate

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
		Determining Nitrate and Nitrite Levels in Vegetables. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 11, No. 3, 2003, Pages 233-238	volumetric flask. The flask in 80°C bath for 20 min., shaken and cooled, and diluted to 100 mL with DI water. Portion filtered through a 0.45 µm syringe filter. Analysis by HPLC-UV (213 nm), Luna C18 HPLC column (5 µm, 250 x 4.6 mm i.d.), mobile phase 0.01 M octylammonium orthophosphate of aqueous 30% (v/v) methanol of pH 7.0 for the mobile phase at flow rate of 0.8 mL/min, injection volume 10 µL.					obtained CV values less than 1.5%,	and nitrite spiked were in the range of 96.6 ~ 108.7% and 98.9 ~ 105.7%, respectively
15	Chile	Connolly et al (2001) Rapid determination of nitrate and nitrite in drinking water samples using ion interaction liquid chromatography. Analytica Chimica Acta 441 53-62		Water (not suitable for further review)					
16	Chile	Ferreira et al. (2008) Quantification of residual nitrite and nitrate in ham by reverse-phase high performance liquid chromatography/diode array detector. Talanta 74:1598-1602	RP-HPLC/diode array detection for nitrites and nitrates in ham. Using a HyPurity C18, 5 µm column & gradient elution with 0.01M n-octylamine and 5mM tetrabutylammonium hydrogeno-sulphate to pH 6.5.	Ham (cooked and dried)		Nitrites and nitrates with 0.019 and 0.050 mg/kg, respectively		Coefficients of variation lower than 2.89% and 5.47% were obtained for nitrite and nitrate, respectively (n = 6).	Recoveries of residual nitrite/nitrate ranged between 93.6% and 104.3%.
17	Chile	UNE-EN 12014-1: 1997. Food products. Determination of nitrate and / or nitrite content. Part 1: General. (see EU Line 26)							
18	Chile	UNE-EN 12014-1 / AI: 2001. Food products. Determination of nitrate and / or nitrite content. Part 1: General. (see Chile line 17 & EU Line 26)	Note: this provides only amendments to UNE-EN 12014-1: 1997; it is till only a summary of EN methods for foodstuffs. So not suitable for review inclusion.						
19	Chile	UNE-EN 12014-2: 2018. Food products. Determination of nitrate and / or nitrite content. Part 2: Method by high							

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
		performance ion exchange liquid chromatography (HPLC / IC) for the determination of nitrate content in vegetables and horticultural products. (see EU Line 27)							
20	Chile	UNE-EN 12014-3: 2006. Food products. Determination of nitrate and / or nitrite content. Part 3: Spectrometric determination of nitrate and nitrite content in meat products after enzymatic reduction of nitrate to nitrite. (see EU Line 30)							
21	Chile	UNE-EN 12014-4: 2006. Food products. Determination of nitrate and / or nitrite content. Part 4: Method by ion chromatography (IC) for the determination of nitrate and nitrite content in meat products. (see EU Line 31)							
22	Chile	UNE-EN 12014-5: 1997. Food products. Determination of nitrate and / or nitrite content. Part 5: Enzymatic determination of nitrate content in food based on vegetables, for children and babies. (see EU Line 27)	Also see similar principle used by R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2012/06/roche_ifu_nitrate_10905658035_en-v9_2019-11.pdf						
23	Chile	UNE-EN 12014-7: 2000 Food products. Determination of nitrate and / or nitrite content. Part 7: Continuous flow method for the determination of nitrate content in vegetables and products derived from vegetables after reduction with cadmium. (see EU line 29)							
24	Colombia	AOAC 973.31-1996(1997) (see Chile line 10)	Nitrites in cured meat – colorimetric method	Cured meat, including in canned					

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
				corned beef and luncheon meat					
25	Colombia	AOAC 935.48-1996	Nitrates and Nitrites in meat – Xylenol method. Nitrate ion react with 2,4-xylenol in sulfuric acid, steam-distilled and measured at 450 nm. Nitrite is oxidise to nitrate with potassium permanganate and determined by difference.	Meat	NO2 & NO3 individually				
26	EU	EN 12014-1 1997. Revision-A1 (1999). Foodstuffs — Determination of nitrate and/or nitrite content — Part 1: General considerations. European Committee for Standardization (CEN)	Note: this is only a summary of EN methods for foodstuffs. So not suitable for review inclusion. Note: EN decided to not consider any methods involving the use of open sources of spongy cadmium on the grounds of its potential threat to the environment. As a result, the only methods available for inclusion in this standard were vertical methods for the particular substance of interest.						
27	EU	EN 12014-2 1997. Foodstuffs — Determination of nitrate and/or nitrite content — Part 2: HPLC/IC method for the determination of nitrate content of vegetables and vegetable products. European Committee for Standardization (CEN). (This reference has been replaced by EN 12014-2:2018, with lower LOQ, extensively revalidated and precision data in Annex B), inclusion of iceberg lettuce verified by interlaboratory testing, update of HPLC/IC-conditions and chromatograms in Annex A.	For Liquid samples, e.g. vegetable juice – shake and filter. For Solid samples, e.g. leaf vegetable and Pasty samples, e.g. mashed vegetables, homogenize and weigh approximately 10 g of material add approximately 400 ml of hot water (approximately 80°C) & place into a boiling water bath for 15 min. & dilute to 500 ml. Filter. For low nitrate, make appropriate adjustments, to the initial test portions and volumetric ratios but check modified method performance. The determination is performed either by reverse-phase HPLC and UV detection, or by IC and conductivity or UV detection.	Vegetables and vegetable products including Liquid samples e.g. vegetable juice; Solid samples, e.g. leaf vegetable; Pasty samples, e.g. mashed vegetables	NO2 & NO3 individually (Laboratory experience has shown that this analytical method is also suitable for the determination of nitrite in other matrices; however, this has not been validated in the interlaborato		25 mg/kg nitrate. Note, modifications allowed for low concentrations, but require performance checks. Beheshti et al 2023 reports LOQ of 0.2 mg/kg for nitrate	naturally contaminated Beetroot juice, Puréed carrots, and Iceberg lettuce repeatability of 7.2, 12.7 & 6.26%; and Reproducibility of 26.3%, 46.2% & 19.6% respectively.	

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
					ry test scheme cited here).				
28	EU	EN 12014-5 1997. Foodstuffs — Determination of nitrate and/or nitrite content — Part 5: Enzymatic determination of nitrate content of vegetable-containing food for babies and infants. European Committee for Standardization (CEN).	Nitrate is reduced by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) to nitrite in the presence of the enzyme nitrate reductase (NR). The amount of NADPH oxidized during the reaction is stoichiometric to the amount of nitrate. The decrease in NADPH is measured by means of its light absorbance at 340 nm.	Vegetable containing foods for babies and infants	NO3 only.	NA	50 mg/kg nitrate ion	See EN 12014-5: 1997 Annex B Precision data	NA
29	EU	EN 12014-7 1998. Foodstuffs — Determination of nitrate and/or nitrite content — Part 7: Continuous flow method for the determination of nitrate content of vegetables and vegetable products after Cadmium reduction. European Committee for Standardization (CEN)	Homogenise frozen vegetable, weigh 40g, add 35g extraction buffer (only needed if nitrite is to be detn.) & 325g water. Homogenise and filter. Test portion extracted with water, filtered. Portion of nitrate ions diffuses in dializing unit of continuous flow system, into slightly alkaline buffer solution and reduced to NO2 by Cd column. NO2 ion quantitated colorimetrically after Griess reaction & absorbance measurement between 520-540nm.	Vegetables and vegetable products (precision data provided for beetroot(2), lettuce(3), endive, spinach).	NOx only (unless nitrite quantified and subtracted from NOx to quantify Nitrate. (see EN 12014-7: 2000 Annex E Nitrite analysis).	NA	50 mg/kg nitrate ion	See EN 12014-7: 2000 Annex C Precision data (acceptance criteria repeatability and reproducibility $\leq 5\%$).	NA. Note-absorbance maxima of beetroot extract & diazotized NO2 solutions are nearly identical. Thus, NO3 or NO2 values corrected for blank absorption for beetroot extracts & increasing MU.
30	EU	EN 12014-3 2005. Foodstuffs — Determination of nitrate and/or nitrite content — Part 3: Spectrometric determination of nitrate and nitrite content of meat products after enzymatic reduction of nitrate to nitrite. European	Weigh, 10 g of the homogenized sample. Add about 50 ml of water and homogenize, & sodium hydroxide to adjust pH-value to 8,0 to 8,5. Heat the flask for 15 minutes in a boiling water bath, shaking several times. Cool, add 4 ml each of Carrez solutions No. 1 and No. 2,	meat products	NO2 & NOX (NO3 by subtraction)		for total nitrite and nitrate content from 5 mg/kg up to 125 mg/kg calculated as	See EN 12014-3: 2006 Annex A Precision data	NA

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
		Committee for Standardization (CEN)	shaking & dilute to 200mL, filter. Nitrite in extract treated with sulfanilamide and NED. The formed red compound is measured spectrometrically at $\lambda=540$ nm. Nitrate extract is converted into nitrite by nitrate reductase. The treated as above for nitrite, the sample nitrate content is calculated from the difference between the spectrometric measurements.				sodium nitrite.		
31	EU	EN 12014-4 2005. Foodstuffs — Determination of nitrate and/or nitrite content — Part 4: Ion-exchange chromatographic (IC) method for the determination of nitrate and nitrite content of meat products. European Committee for Standardization (CEN).	Weigh, 10g homogenized sample. Add 50 ml of water at 50 °C to 60 °C and mix. Add 50 ml acetonitrile, mix gently, cool to room temperature and dilute to 200mL with water. Filter with fluted filter paper and then 0.45 μ m membrane filter. Prepare blank replacing the test portion by 10 ml of water. The nitrate and nitrite contents determined by ion-exchange chromatography (IC) and ultraviolet (UV) detection at a wavelength of 205 nm, isocratic Lithium borate gluconate buffer solution /acetonitrile mobile phase at 1 ml/min, ≥ 40 μ L injection.	meat products, vegetables and baby food. (Nitrite in meat products greater than 40 mg/kg)	NO2 & NO3 individually	The limit of detection (LOD) for nitrate was 10 mg/kg (EFSA 2017)	50 mg/kg nitrate ion; 40 mg/kg as nitrite ion	See EN 12014-4: 2006 Annex B Precision data.	NA
32	EU	EN ISO 14673-1:2004. Milk and milk products — determination of nitrate and nitrite contents - Part 1: method using cadmium reduction and spectrometry. ISO, Geneva. See IDF line 57							
33	EU	EN 14673-2:2004. Milk and milk products — determination of nitrate and nitrite contents — Part 2: method using segmented flow analysis (routine method). ISO, Geneva. See IDF line 58							

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
34	EU	EN 14673-3:2004. Milk and milk products — determination of nitrate and nitrite contents — Part 3: method using cadmium reduction and flow injection analysis with in-line dialysis (routine method). ISO, Geneva. See IDF line 59							
35	EU	ISO 2918:1975 Meat and meat products -- Determination of nitrite content (Reference method).	Extraction of a test portion with hot water, precipitation of the proteins and filtration. In the presence of nitrite, development of a red colour by the addition of sulphanilamide and N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride to the filtrate and photometric measurement at 538 nm.	meat and meat products	NO2 only.	No validation data.			
36	EU	ISO 4099:1984 Cheese -- Determination of nitrate and nitrite contents -- Method by cadmium reduction and Photometry (<i>withdrawn and replaced by ISO 14673-1:2004 IDF 189-1:2004; ISO 14673-2:2004 IDF 189-2:2004; & ISO 14673-3:2004 IDF 189-3:2004, thus not suitable for further review</i>)							
37	EU	Butt et al 2001, Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography. Talanta 55 (4), 789-797	Normal phase ion-pair HPLC has been used for simultaneous separation of nitrite and nitrate using tetraethylammonium (TEA)+ as ion-pairing reagent and UV detector. The performance of the proposed method is compared with ion chromatography for quantification of the anions in food samples, such as spinach and lettuce.	spinach and lettuce	NO2 & NO3 individually	NA	NA	The developed method is capable of analyzing nitrite and nitrate in the presence of 50-fold concentration of chloride and sulfate	NA

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
								with a maximum RSD of 10%, with shorter analysis time.	
38	EU	Siu et al 1998, Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products. Journal of Chromatography A 804, 157-160	Ten grams of ham or salami, deionized water added to a final volume of 100mL. Homogenized in a blender heated and the temperature was maintained between 70°C and 80°C for 15 min. Cooled to room temp and centrifuged at 4960 g for 10 mins. Supernatant was removed and filtered successively with Whatman No. 2 & GF/A filters, and then through the 1.2 µm and 0.2 µm Acrodisc filters. Nitrate and nitrite were separated using Dionex DX500 with AD20 UV-Vis detector, isocratic conditions with an IonPac AG11guard column and AS11 analytical column—5 mM sodium hydroxide for 10 min, followed by a column wash with 100 mM sodium hydroxide for 5 min, and equilibration with 5 mM sodium hydroxide for 10 min. The injection volume was 25 µl and eluent flow-rate was 1 ml /min. Analytes were detected using UV detection at 225 nm.	Meat products: Salami, Ham.	NO2 & NO3 individually	Detection limits for nitrate and nitrite from the extracts, 0.5 mg/kg and 0.3 mg/kg for the meat sample), respectively		%RSD Nitrate 1.0-2.9% (N=5), Nitrite 2.3-1.7% (N=5).	Meat spike recoveries were between 90% and 100% for nitrate, and between 90% and 105% for nitrite.
39	EU	McMullen et al 2005. Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in vegetable and fruit baby foods. Journal of AOAC International 88, 1793-1796 See Chile line 9							
40	EU	Stalikas et al 2003 Ion chromatographic method for the	IC with post-column IFD to determine simultaneously nitrite and	Salami		Not specified,			Recoveries from

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
		simultaneous determination of nitrite and nitrate by post-column indirect fluorescence detection. Journal of Chromatography A 1002, 237-241	nitrate, at an emission wavelength of 355 nm after excitation at 270 nm.			but this reviewer estimates LOD at ≈5mg/kg based on peak size & RSDs.			fortified samples salami compared to AOAC method was 95% Nitrate (N=3) and 96% Nitrite (N=3).
41	EU	Merino et al. 2000. Liquid chromatographic determination of residual nitrite/nitrate in foods: NMKL collaborative study. Journal of AOAC International 83, 365-375. See Brazil line 4 and Chile line 11 .							
42	EU	Di Matteo V and Esposito E, 1997. Methods for the determination of nitrite by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Chromatography A 789 (1-2), 213-219	This is a review of other papers where three different papers included either Fish and cured meats, or Meat products, or Meat. But all with different method parameters and only provided LoD, no precision or accuracy. Thus, not considered suitable for further review.						
43	EU	Iammarino et al. 2013. Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: results of five years of official controls and monitoring. Food Chemistry, 140, 763-771	in-house validated ion chromatographic method with electrochemical detection. In this work the results obtained from 5 years of official controls and monitoring focused on tracing quantifiable amounts of nitrites and nitrates in 1785 samples: 200 fresh meats (beef, pork, horse and chicken), 1195 meat products (fresh meat preparations, cured meats and other meat products), 180 dairy products ("mozzarella" cheeses, short and lengthy maturation	fresh meats (beef, pork, horse and chicken); meat products (fresh meat preparations, cured meats and other meat products); dairy products ("mozzarella" cheeses, short and lengthy maturation cheeses); shellfish & leafy vegetables.	NO2 & NO3 individually	The LOD for nitrate was 3.2 mg/kg. (EFSA 2017 p17)			Acceptable agreement in the comparative performance of both methods was reported. (EFSA 2017 p17)

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
			cheeses), 120 shellfishes (mussels and clams) and 90 leafy vegetables (fresh and frozen spinaches and lettuces). Analyses performed from 2007 to 2011 using a validated ion chromatography with conductivity detection method.						
44	EU	Croitoru MD, 2012. Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UVNIS technique. Journal of Chromatography B, 911, 154-161	HPLC-UV/VIS method, for matrices including vegetal samples based on a pre-column derivatization of nitrite anion using the Griess reaction and direct determination of nitrate using its UV absorbance. A chromatographic process with detection at two wavelengths allows the determination of both anions in one run (23 min with column re-equilibration included).	vegetables and fruits were tested: white & red potatoes, red & white onion, garlic, beetroot, carrot, parsley, celery, parsnip, tomatoes, cucumbers, cabbage, red cabbage, lettuce, radish, different types of apples, oranges, kiwi, strawberries, lemon, and tangerine.	NO2 & NO3 individually	In the case of vegetables, the limits of detection 0.2 mg/kg. For the vegetables and fruits were tested, no interferences were recorded and only about 5% of the samples fall under the LODs.	0.6 mg/kg	Using the spike studies described under recovery with 5 samples for every type of product tested, the coefficients of variations recorded for every concentration level did not exceed 5%.	For accuracy, a spiked samples technique used. The content of nitrate and nitrite present in samples before spiking subtracted from final values using potato, onion & apple samples. Recovery range 97.20 and 103.55% for nitrate and 98.29 and 104.05% for nitrite.
45	EU	Oztekin et al 2002. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by	Meat products (10 g) were weighed in a beaker. DI water (150 ml) added, blended & suspension incubated 15min at 50°C. Cooled &	Cured meat products and fresh vegetables - Salami, Ham, Turkey	NO2 & NO3 individually	LOD for nitrite corresponding to a		Reproducibility of the method for six	Four cured meat products and four

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
		capillary electrophoresis. Food Chemistry 76, 103-106	diluted to 250 ml, filtered with filter paper & 0.45-mm cellulose acetate filter disc, internal standard (KSCN) added and made to volume. Separations with a commercial CE injection system with an on-column variable UV-Visible detector at 210 nm. The fused silica capillaries 75 mm I.D., capillary length was 75 cm, and the length to the detector was 60 cm. Washing for 2 min with 0.1 mol/l HCl and 2 min with buffer between runs was applied.	sausage, Sausage, Spinach, Parsley, Dill, Leek		signal/ noise ratio of three is 0.105 µg/ml and for nitrate is 0.099 µg/ml. Corresponds to 4 mg/kg nitrite in real samples.		successive injections of turkey sausage sample, give 4.51 %RSD for NO2, and 2.54 %RSD for NO3.	vegetables, with recovery data for nitrite 94-103% and nitrate 92-106%.
46	EU	Ensafi et al., 2004. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow injection analysis. Analytical Sciences 20 (12), 1749-1753	For the beef sausage, 5.0 g of sample was mixed and homogenized. The mixed sample digested carefully by heating of solution content in water for 2 h. The mixture was filtered (Whatman No. 1) and diluted to 100 ml. Analysis by a flow injection spectrophotometric method for simultaneous determination of nitrite and nitrate based on the catalytic effect of nitrite on the oxidation of Pyrogallolsulfonephthalein with bromate in acidic media.	Water and sausage samples	NO2 & NO3 (NO3 by subtraction)	The detection limits for nitrite were 1.6 ng ml ⁻¹ and for nitrate were 3.0 ng ml ⁻¹ (S/N = 3). LOD provided only for water samples, not the sausage.		The relative standard deviation (n = 10) was 2.8% and 3.7% at 0.080 µg ml ⁻¹ nitrite and nitrate, respectively.	To validate the accuracy of the proposed method, the results were compared with a Griess standard method using increasing concentrations 94-103% NO2 recovery, & 110-94% NO3 recovery.
47	EU	Casanova et al., 2006. Use of Griess reagent containing vanadium(III) for post-column derivatization and simultaneous determination of nitrite and nitrate in baby food. Journal of	Ion chromatographic/ spectrophotometric method (Griess reaction and spectrophotometric detection @ 535 nm) and AOAC Method 993.03 yielded comparable results for various baby foods that contained	baby food – including Carrots, Spinach, Green beans, Banana, Squash, Mango, Grapes.	NO2 & NO3 individually	LOD not specifically stated.	≤4 mg/kg. LOQ not specifically stated.	Spike recoveries for 4 baby food (sample N=5) Nitrite 1.3% -	Recoveries of NOx from various fortified

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
		AOAC International 89 (2), 447-451	incurred nitrate. The reduction of nitrate to nitrite was accomplished by the online post-column addition of VCl_3 rather than by using Cd. Nitrate and nitrite ions were extracted from the fruit and vegetable baby foods with 50–60°C water or with buffer, followed by clarification with acetonitrile and centrifugation.					19.4% RSD; Nitrate 2.4% - 7.9	baby food fruits and vegetables (25–400 ppm) ranged from 82 to 107%.
48	EU	Andrade et al. 2003. A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation. Food Chemistry 80, 597-602.	Method is based on the reduction of nitrite and nitrate to nitric oxide, with subsequent reaction with iron (II) and thiocyanate in an acid medium, forming FeSCNNO^+ . The absorbance of the complex, with a maximum at 460 nm, is proportional to the nitrite and nitrate concentrations.	vegetables and meat products	NO2 & NOX (NO3 by subtraction)	For a sample of 5.0 g, the determination limit of the method was 20 and 13 mg kg ⁻¹ of nitrate and nitrite, respectively.	NA	Precision comparable to reference spectrophotometric method (AOAC reference method for the determination of nitrate in foodstuffs).	Accuracy comparable to reference spectrophotometric method (AOAC reference method for the determination of nitrate in foodstuffs).
49	EU	Kazemzadeh et al., 2001. Sequential flow injection spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in various samples. Analytica Chimica Acta 442, 319-326	Method based on the reaction of nitrite with safranin O to form a diazonium salt which caused the reddish-orange dye colour of the solution to be changed to blue in acidic media, and which absorbs at 520 nm. The injected sample in the flow injection system is split in two streams. One of the streams is transported through a reductor microcolumn containing copperised cadmium, where nitrate is reduced to nitrite. The two streams are then mixed and treated with the appropriate reagents.	Meat, flour, cheese etc.	NO2 & NOX (NO3 by subtraction)	Detection limits (3σ) of 0.5 and 3 ng ml ⁻¹ were obtained for nitrite and nitrate, respectively (presumably for the sample in solution)	NA		
50	EU	NMKL (Nordic Committee on Food Analysis), 2013. Determination of nitrate and/or	Spectrophotometric method for the determination of nitrate/nitrite content in foodstuffs and water after	vegetables (lettuce), meat products, baby food, dairy product	NO ₂ & NO _x (NO ₃ by subtraction)	5 mg/kg (meat products –			

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
		nitrite in foodstuffs and water by spectrophotometry after zinc reduction and Griess reaction. NMKL No. 194	zinc reduction and Griess reaction. (The Griess reaction is specific for nitrite. Analysis of nitrate by this reaction requires chemical or enzymatic reduction of nitrate to nitrite prior to the diazotization reaction(Tsikas D. 2007)	(milk) and surface water - method validated for above foods		EFSA 2017 p 16)			
51	EU	Chung et al. 2011. Nitrate and nitrite levels in commonly consumed vegetables in Hong Kong. Food Additives and Contaminants, 4, 34-41	Levels of nitrate and nitrite were determined by ion chromatography and flow injection analysis, respectively.	vegetables -leafy, legumes, root and tuber, and fruiting	NO2 (by FIA) & NO3 (by IC) individually	Nitrite 0.8 mg/kg, Nitrate 4 mg/kg.	NA	NA	NA
52	EU	Leth et al., 2008. Nitrite and nitrate content in meat products and estimated intake in Denmark from 1998 to 2006. Food Additives and Contaminants, 25, 1237-1245	Nitrite and nitrate were extracted from the samples by mixing 5 min with hot water (70°C). Protein was precipitated with addition of Carrez solution I and II and the suspension was filtrated. The filtrate was injected in a FIA system, where sulphanilamide and N-(1-naphtyl)-Ethylenediammonium-chloride were added to the carrier stream to react with nitrite to form a violet azo colour which was measured spectrophotometrically at 540 nm. For nitrate, after injection, the carrier stream went through a Cd-column where nitrate was reduced to nitrite which subsequently reacted to form the azo colour.	Liver paste; paté; fatty meat intended to be used in sandwiches; lean meat intended to be used for sandwiches; salami; sausages for dinner; medium fat and fat pork meat for dinner	NO2 & NOX (NO3 by subtraction)	Detection limit for NaNO2 was 3 mgkg ⁻¹ and for NaNO3 5mgkg ⁻¹ .		Article reporting a survey where for QA/QC reference material of freeze-dried dill and a recovery experiment for both nitrate and nitrite. Depending on sample type and concentration level an average recovery of 100% for nitrate and 95% for nitrite was found and RSD% between 2 and 4% for NO2 & between 2	

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
								and 5% for NO3.	
53	EU		Didn't review 16 articles for 'Methods for the quantitative determination of nitrite alone'.						
54	Indonesia	Egan, H., Kirk, R.S. and Sawyer, R. 1981. Pearson's Chemical Analysis of Foods. 8 th Edition, Churchill Livingstone, London, NY	analyze nitrate and nitrite is Spectrophotometric.						
55	Malaysia	Determination of Nitrite and Nitrate in Meat using Ion Chromatography (Methrohm): US Environmental Protection Agency, (EPA Method 9056A), Rev. 1, Nov. 2000	IC-Cond, sequential determination of anions including nitrate (NO3), nitrite (NO2), in aqueous samples, such as drinking water, wastewater, aqueous extracts of solids, and the collection solutions from the bomb combustion of solid waste samples.	Not specifically for food so would need to review Malaysia method validation in food matrices. Thus, not considered suitable for further review.					
56	Thailand	Analysis of residual nitrates and nitrites in food is High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method - UV detector (Journal of Food and drug Analysis, Vol.11, No.3, 2003, p233-238) see Chile line 14							
57	IDF	ISO 14673-1 IDF 189-1: 2004 — Milk and milk products — Determination of nitrate and nitrite — Part 1: Method using cadmium reduction and spectrometry	A test portion is dispersed in warm water, with precipitation of the fat and proteins, then filtration. The nitrate ions are reduced to nitrite ions in a portion of the filtrate by means of copperized cadmium. A red colour is developed in portions of both unreduced filtrate and the reduced solution, by addition of sulfanilamide and N-1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride. Spectrometric measurements are carried out at a wavelength of 538 nm. May be performed using automatic equipment, in particular by	Milk and milk products - whole and partly skimmed and skimmed dried milk; hard, semi-hard and soft cheeses; processed cheese; whey cheese, caseins and caseinates and dried whey	NO2 & NOX (NO3 by subtraction)			See ISO 14673-1 IDF 189-1: 2004 section 11 for precision	

Ligne #	Membre/ Observateur	Méthode de référence	Principe	Portée de la matrice	NO2 et NO3 séparément ou en combinaison	Limite de détection (LD)	Limite de quantification (LQ)	Précision	Récupération
			segmented flow analysis (SFA) or flow injection analysis (FIA)						
58	IDF	ISO 14673-2 IDF 189-2: 2004 — Milk and milk products — Determination of nitrate and nitrite — Part 2: Method using segmented flow analysis (Routine method)	A test portion is suspended in water. Part of the suspension is transferred to the analyser for dialysis. The nitrate ions are reduced to nitrite. The nitrite content is determined by a segmented flow analysis and spectrometric detection. Any nitrite present is determined as nitrate. A correction for the nitrite present can be applied after determination of the nitrite content.	Milk and milk products - milk, cheese, and liquid and dried milk products and infant foods.	NO2 & NOX (NO3 by subtraction)			See ISO 14673-2 IDF 189-2: 2004 section 11 for precision	
59	IDF	ISO 14673-3 IDF 189-3: 2004 — Milk and milk products — Determination of nitrate and nitrite — Part 3: Method using cadmium reduction and flow injection analysis with in-line dialysis (Routine method)	A test portion is suspended in a warm extraction buffer solution. Fat is separated by centrifuging and rapid cooling. Analyses are made of small portions of the de-fatted solution by flow injection analysis (FIA). In-line dialysis is used to remove protein and remaining fat. The nitrate ions are reduced to nitrite ions by cadmium. The nitrite ions are reacted with sulfanilamide and N-1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride to give a red coloured azo dye. The colour is measured in a flow cell at maximum absorption of the dye at 540 nm with reference to the absorption measured at 620 nm.	Milk and milk products - hard, semi-hard and soft cheeses of various ages, and processed cheese; whey powder, milk powder and milk-based infant food.	NO2 & NOX (NO3 by subtraction)	The detection limits of the method are 0,5 mg of nitrate ions per kilogram and 1,0 mg of nitrite ions per kilogram, respectively.		See ISO 14673-3 IDF 189-3: 2004 section 11 for precision.	

Index:

IC-Cond.: Chromatographie ionique avec suppression chimique de la conductivité de l'éluant.

Colorimetry – NED: Méthode colorimétrique - réaction de diazotation-couplage du sulfanilamide avec le chlorhydrate de N-(1-naphtyl)éthylènediamine (NED). Réaction de Griess.

NA Non disponible.

 Cette référence n'est pas considérée comme appropriée pour un examen plus approfondi.

 Cette référence est répétée et donc consolidée sous une seule ligne de référence.