

COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



Organización
Mundial de la Salud

S

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia - Tel: (+39) 06 57051 - Correo electrónico: codex@fao.org - www.codexalimentarius.org

Tema 6 del programa

CX/MAS 24/43/8

Abril de 2024

PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS COMITÉ DEL CODEX SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS Y TOMA DE MUESTRAS

Cuadragésima tercera reunión

Budapest (Hungria)

13 - 18 de mayo de 2024

CRITERIOS DE RENDIMIENTO NUMÉRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS IONES NITRATO Y NITRITO EN DETERMINADAS MATRICES ALIMENTARIAS

(Documento preparado por Australia y los Estados Unidos de América)

ANTECEDENTES

1. El CCFA, en su 51.^a reunión (2019), acordó adoptar un enfoque de gestión de riesgos que establecería niveles tanto de entrada como de residuos para nitratos y nitritos en la *Norma general para los aditivos alimentarios* (NGAA) (CXS 192-1995). En su 52.^a reunión (2021), el CCFA solicitó al CCMAS que:
 - i. estableciera criterios para la detección de iones nitrato y nitrito en una variedad de matrices alimentarias, específicamente lácteos (queso), carne y mariscos, y
 - ii. proporcionara información sobre los métodos de detección disponibles que cumplan los criterios establecidos y, además, si el método podía detectar ambos iones y, en caso afirmativo, si el método detecta cada ion por separado o solo en combinación.
2. El CCMAS, en su 42.^a reunión (2023), en respuesta a esta solicitud, señaló que era necesario seguir estudiando la cuestión para dar una respuesta al CCFA. Por ello, creó un grupo de trabajo electrónico (GTE) presidido por los Estados Unidos de América, que trabajaría en inglés, con arreglo al siguiente mandato:
 - establecer criterios de rendimiento numéricos para la determinación de iones nitrato y nitrito en las matrices alimentarias enumeradas en el CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 2;
 - revisar los métodos que figuraban en CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 1 y determinar si estos métodos cumplen los criterios de rendimiento numéricos establecidos para las matrices del CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 2;
 - discutir si los métodos determinan tanto los iones nitrato como los nitrito y, en caso afirmativo, si los métodos detectan cada ion por separado o solo en combinación, y
 - debatir si los distintos sistemas de determinación (por separado o combinados) pueden influir en la precisión y exactitud de los métodos.
3. Finalmente no se constituyó ningún GTE. No obstante, Australia y los Estados Unidos de América (EE. UU.) avanzaron en los trabajos de acuerdo con el mandato descrito en el apartado 2.
4. Por tanto, este informe se basa en la actividad siguiendo lo recomendado en la 42.^a reunión del CCMAS (2023). El informe también contiene los siguientes apéndices:
 - i. Apéndice 1: Disposiciones para nitratos (Sistema Internacional de Numeración 251, 252) y nitritos (SIN 249, 250) en el procedimiento de trámites o adoptadas (niveles de uso entrantes y residuales) basadas en CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 2, incluida información sobre los niveles residuales más bajos propuestos¹ para disposiciones representativas en productos lácteos (queso), carne y mariscos, y destacando las secciones pertinentes de la *Norma general para los aditivos alimentarios* (CXS 192-1995), muy especialmente la pág. 183, y

¹ El uso del término «nivel residual más bajo propuesto» sugiere un límite de cuantificación (LC) del método deseado, no un límite máximo de especificación.

- ii. Apéndice 2: Resumen de los comentarios sobre los métodos de prueba disponibles para los nitratos y nitritos que figuran en CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 1.

DEBATE

Establecer criterios de rendimiento numéricos para la determinación de iones nitrato y nitrito en las matrices alimentarias enumeradas en el CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 2

5. La parte sobre «LM residual (mg/kg)» en CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 2 proporcionó un LC sugerido para los métodos y no el límite máximo «LM» que el CCMAS requeriría para el desarrollo de criterios de rendimiento del método. La única subcategoría (producto) enumerada con una disposición de LM adoptada en CXS 192-1995 era «01.6.2.1 (*Queso madurado, incluida la corteza*)». Para obtener los otros posibles valores de LM de la subcategoría, se utilizaron los propuestos en los «Comentarios presentados sobre el Apéndice 5 de la NGAA: Disposiciones para nitratos (SIN 251, 252) y nitritos (SIN 249, 250) en el procedimiento de trámites o adoptadas (niveles de uso de entrada y residual)» (CX/FA 21/52/7, Apéndice 5). Los posibles LM y los criterios de rendimiento correspondientes figuran en el Apéndice 1, con la nota de que podría haber un número de subcategoría mal asignado para el «queso fundido».
6. Para cumplir los requisitos del CCFA solicitados, un método tendría que cumplir todos los criterios de rendimiento del método especificados (incluido el LC), y también tendría que tener un LC inferior al «LM residual (mg/kg)» más bajo en CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 2 para la matriz alimentaria en cuestión.

Revisar los métodos que figuran en CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 1 y determinar si estos métodos cumplen los criterios de rendimiento numéricos establecidos para las matrices del CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 2

7. Los métodos enumerados en CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 1 se han cotejado con datos de rendimiento libremente disponibles y también se han enumerado a continuación en el Apéndice 2 (aparte de UE - «Métodos para la determinación cuantitativa de nitrito solo» que incluía otros 16 métodos sugeridos). El Apéndice 2 recoge 59 sugerencias de métodos procedentes de 10 países miembros, organizaciones miembros u organismos de normalización, con algunas repeticiones (18 casos en los que la presentación del método fue repetida por otro miembro u organización).
8. Cuando las presentaciones de métodos no incluían alimentos en su ámbito de aplicación, o se trataba solo de un resumen de métodos, estas se consideraron «no aptas para seguir siendo estudiadas» (siete casos). De este modo, quedaron 34 métodos para ser considerados con respecto a los criterios de rendimiento del método (de los cuales 14 eran métodos normalizados por AOAC, NMKL, ISO, IDF o EN) para diversos ámbitos alimentarios, incluyendo solo o, en algunos casos, en combinación de: carne y productos cárnicos, alimentos para lactantes, hortalizas y productos vegetales, leche y productos lácteos, frutas y mariscos. Obsérvese que solo un método incluía «Pescado y productos a base de pescado» en el ámbito de aplicación y, en este caso «Mariscos (mejillones y almejas)». Muchos métodos incluían «colorimetría o reacción de Griess» {algunos automatizados con análisis de flujo segmentado (SFA) o análisis de inyección de flujo (FIA)} y medían «NO₂ y NO_x (NO₃ por sustracción)», mientras que otro grupo mayor incluía «HPLC» con varios detectores y medía «NO₂ y NO₃ individualmente».
9. Cabe señalar que solo un número limitado de métodos publicados antes de 2005 proporciona un conjunto completo de datos de validación para su comparación con los criterios de rendimiento del método. Los métodos publicados entre 1995 y 2005 tendían a proporcionar datos de LD o LC y de precisión. Antes de 1995, la publicación de datos de validación es escasa y los métodos estandarizados desde 2010 tienden a incluir datos de ensayos colaborativos. Los artículos publicados sobre investigación de métodos normalmente solo proporcionaban la validación de un único laboratorio, pero pueden comparar los resultados con métodos estándar o utilizar un material de referencia certificado en su validación.
10. En el caso de los alimentos en los que el nitrito/nitrato se utiliza como «aditivo», ha habido una tendencia a reducir los niveles «residuales» en los alimentos en los que no aumentó el número de casos de botulismo informados. Esto llevó a realizar más estudios sobre el nivel endógeno de diversos alimentos y a reducir los métodos de LC en general. Cuando un método estandarizado cumplía con toda probabilidad los criterios y se ensayaba en colaboración, este método se incluía preferentemente en la lista, en contraste con un «método validado por un único laboratorio». Por lo tanto, podría ser útil

complementar la lista de métodos con métodos publicados más recientemente, ya que los métodos publicados más recientemente serían de 2018 (es decir, de hace 5-6 años) y se espera que se actualicen más métodos estandarizados.

11. Curiosamente, en el artículo de Zhong *et al.* 2021² se afirma que los criterios de extracción de datos que aplicaron fueron: a) el método espectrofotométrico basado en la reacción de Griess utilizado como método de referencia, y b) la fiabilidad y aplicabilidad de los métodos clasificados como ensayo de Griess (por ejemplo, Método 993.03 de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) > métodos cromatográficos (cromatografía iónica y otras cromatografías líquidas de fase inversa (LC), LC-MS, cromatografía de gases (GC), GC-MS) > métodos espectrofluorimétricos > electroforesis capilar > quimioluminiscencia [Wang *et al.* 2017³]. Además, se enumeran menos de 10 referencias para nitrato y nitrito mg/kg en «Pescado y productos de mariscos». Para ver cómo podrían utilizarse métodos con LD/LC reducidos, puede consultarse un estudio de Lacumin *et al.* 2019⁴ para determinar el nivel de concentración «natural» de nitritos y nitratos en la carne cruda, la sal y la sugna (grasa de cerdo blanda) utilizadas para producir jamón curado en seco San Daniele (SDDCH) y en SDDCH (DOP). «Natural» significa que ninguno de los dos compuestos ha sido añadido deliberadamente por los productores durante la elaboración del jamón. Los datos obtenidos pusieron de manifiesto que la concentración de nitrito y nitrato en jamón curado en seco San Daniele con denominación de origen protegida (SDDCH PDO) debía considerarse natural cuando era inferior a 4 y 22 mg/kg del producto madurado, respectivamente, independientemente del tiempo de maduración (14-19 meses).
12. Los métodos que «probablemente» o «posiblemente» cumplirían los criterios se han incluido en el Apéndice 1, pero aún sería necesario encontrar una fuente de datos de validación adicionales. «Nitrito 09.3.3 (Sucedáneos del salmón, caviar y otros productos a base de huevos de pescado)» tenía un LD/LC muy bajo, que podría alcanzarse con metodologías más recientes, pero probablemente no con los métodos «normalizados» existentes.

Discutir si los métodos determinan tanto los iones nitrato como los nitrito y, en caso afirmativo, si los métodos detectan cada ion por separado o solo en combinación

13. En el Apéndice 2 se enumeran las 5 variaciones de «NO₂ & NO₃ individual o combinado»:
 - NO₂ y NO₃ individualmente,
 - Solo NO_x,
 - Solo NO₂,
 - Solo NO₃,
 - NO₂ y NO_x (NO₃ por sustracción)
14. Como se ha indicado con anterioridad, los métodos que utilizan «HPLC» con varios detectores y electroforesis capilar (CE) suelen medir «NO₂ y NO₃ individualmente».
15. Algunos métodos que utilizan «colorimetría o reacción de Griess» se automatizaron con análisis de flujo segmentado (SFA) o análisis de inyección de flujo (FIA) para medir «NO₂», y así tendrían una porción de prueba separada para someterse a reducción (columnas de Cd o V(III), o Zn) para medir NO_x (como NO₂), con la concentración de nitrato calculada por sustracción y la aplicación de un factor. En otros casos, se supuso que el nivel de nitrito era bajo y, por tanto, la porción de prueba sufriría una reducción, ya que se mediría NO_x pero se informaría como concentración de nitrato.

Debatir si los distintos sistemas de determinación (por separado o combinados) pueden influir en la precisión y exactitud de los métodos

16. Los métodos que determinan el nitrato y el nitrito en una serie de matrices (productos) podrían dejar de ser apropiados si los niveles máximos permitidos se redujeran significativamente con respecto a lo que se exigía históricamente. La mayoría de los métodos normalizados se publicaron en 2006 o antes, con dos excepciones, a saber NMKL n^o 194:2013 y EN 12014-2:2018, por lo que en su mayoría se desarrollaron antes de los recientes avances tecnológicos en la instrumentación disponible comercialmente (incluidos los FIA/SFA, HPLC y CE en ese periodo) y las mejoras que apoyan los ensayos colaborativos y la información del rendimiento del método. Cabría esperar una mejora del LOD/LOQ si estas normas se actualizaran con instrumentos más modernos y ensayos colaborativos. No obstante, también debe tenerse en cuenta que a medida que se busquen LM más bajos y, en consecuencia, LOD y LOQ, las diversas interferencias se harán más evidentes (y cada técnica las

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

⁴ Lacumin *et al.* 2019 Natural levels NO₂ & NO₃ San Daniele dry cured ham PDO, & in meat, salt & sugna used for production. Food Control, Vol.100, p 257-261

tendrá, ya sea por la matriz, los productos químicos o el equipo implicado) y podrían requerir pasos adicionales o técnicas híbridas para mitigar la interferencia. También podría aceptarse una técnica de compromiso que no fuera la más sensible, pero que ofreciera un rendimiento, una viabilidad y una aplicabilidad satisfactorios en condiciones normales de laboratorio, en todos o en la mayoría de los productos.

17. Por ejemplo, se ha comprobado que los análisis por HPLC y por reacción de Griess pueden dar resultados similares para las soluciones acuosas. Sin embargo, la grasa y la proteína agotarían la eficacia de una columna de HPLC y de la célula de espectrometría para la colorimetría, pero mientras que la desproteinización de la solución de Carrez del extracto funcionaría bien con los análisis basados en la reacción de Griess, la solución de Carrez no se recomendaría como solución clarificante para los métodos cromatográficos iónicos. Los parámetros de la reacción de Griess han sido estudiados a fondo por Mohamed *et al.* 2008⁵. Merino *et al.* 2000⁶ informaron de que la solución de Carrez no es recomendable como solución clarificante para los métodos de cromatografía iónica, y también estudiaron la velocidad de agotamiento de los picos de nitrito y nitrato en el jamón. El estudio establece que el pH de la matriz en el momento de la adición de nitrito o nitrato es el que más influye en la estabilidad de estos iones, y concluye que cuanto mayor es el pH, mejor es la recuperación.
18. El estudio de Croitoru 2012⁷ puso de manifiesto las posibles interferencias en la cuantificación de la reacción de Griess y no solo por el color rojo de frutas y verduras, por ejemplo, la remolacha, y ha indicado que hay sustancias capaces de imitar la reacción de Griess, por lo que ya no se la puede considerar específica para el anión de nitrito. Las mediciones espectrofotométricas deben emplearse con precaución, con la formación de sustancias distintas del colorante azoico esperado, por lo que sugerir una separación cromatográfica resolvería los problemas planteados por tales interferencias (que serían más evidentes a concentraciones más bajas).
19. Para los métodos de espectrofotometría que utilizan la reacción de Griess para el nitrito y una reacción de Griess paralela con reducción de Cd, V(III) o Zn para cuantificar el NO_x y la concentración de nitrato por sustracción, aunque bien establecidos, los resultados han sido más exactos si las determinaciones de nitrito y NO_x se completan en paralelo con instrumentación automatizada FIA/SFA para estabilidad y reproducibilidad junto con una columna de reducción en línea. Para los métodos ISO 6635 y de columna de Cd, se ha demostrado que el hierro, el cobre, el cloruro u otros metales por encima de 1 mg L⁻¹ o la materia orgánica en una muestra podrían disminuir la eficacia de la conversión al recubrir la superficie activa del elemento reductor. El Cd ha sido clasificado como presunto agente cancerígeno (Carranzo, 2012⁸; Ferreira *et al.*, 1998⁹), pero este riesgo podría mitigarse (aunque no eliminarse) con las columnas de reducción en línea. También podríamos esperar que la incertidumbre de medición relativa para las concentraciones de nitrito y NO_x de rango medio fuera similar, pero como sustracción, las concentraciones de nitrato de rango medio calculadas tendrían una incertidumbre típica combinada más alta.
20. En la reacción de Greiss con métodos de columna de Cd, la reacción de reducción dependería principalmente del transporte de masa de nitrato a la superficie de Cd o Cu; la eficacia reductora de la mezcla de Cd o Cu debe verificarse cuidadosamente. Cuando las soluciones son demasiado alcalinas o la superficie metálica está demasiado inactiva, sólo se produce una reducción parcial del nitrato a nitrito. Cuando las soluciones son demasiado ácidas o contienen metales altamente electronegativos, el nitrato puede reducirse más que el nitrito. Ambas situaciones provocarían una conversión incompleta del nitrato en nitrito y la consiguiente disminución de la recuperación (Cruz y Martins Loução, 2002¹⁰, Beheshti *et al.* 2023¹¹).

⁵ Mohamed *et al.* 2008 Modification of AOAC Method 973.31 for Determination of Nitrite in Cured Meats JAOACI VOL. 91, NO. 4, p820-7

⁶ MERINO *et al.* 2000 LC Detn of Residual Nitrite-Nitrate in Foods, NMKL Collaborative Study_JAOACI Vol. 83, NO. 2, 2000

⁷ 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

⁸ Carranzo IV (2012) Standard Methods for examination of water and wastewater, Anales de hidrología médica. Universidad Complutense de Madrid, p 185

⁹ Ferreira AM, Rangel AO, Lima JL (1998) Flow injection systems for elemental soil analysis determinations. Commun Soil Sci Plant Anal 29:327-360

¹⁰ Cruz C, Martins Loução M (2002) Comparison of methodologies for nitrate determination in plants and soils. J Plant Nutr 25:1185-1211

¹¹ Beheshti et al 2023 Comparison of three methods for determination of nitrate content in different vegetables. La impresión previa disponible en <https://www.researchsquare.com/article/rs-3071274/v1>

21. Beheshti *et al.* 2023 compararon tres métodos, a saber, el BS EN 12014-2 (HPLC UV/Vis), el ISO 6635, y el de la columna de Cd, para medir el nitrato en 11 hortalizas importantes con una amplia gama desde niveles bajos (como el tomate y la sandía) hasta niveles muy altos de nitrato (como la lechuga, la espinaca y el apio). Se evaluaron las cifras importantes y las limitaciones de cada técnica desde distintos aspectos.
22. En el caso de cromatografía iónica (IC) con detección conductométrica, resultó difícil medir concentraciones bajas de nitrito en presencia de cloruro en masa (Butt *et al.* 2001¹²). Se disponía de varias técnicas para mitigar estos problemas, por ejemplo, Aggrawal *et al.* 2020¹³ sometieron los extractos de muestras a una serie de pasos de limpieza antes del análisis mediante un sistema de IC con un cartucho Dionex OnGuard II RP que elimina de las muestras las sustancias hidrófobas como los hidrocarburos aromáticos. En el cartucho Dionex OnGuard II Ag/H se sobreponen las resinas de los cartuchos Dionex OnGuard II Ag y Dionex OnGuard II H. El cartucho Dionex OnGuard II Ag elimina el cloruro, bromuro y yoduro de las muestras, mientras que en esta aplicación el cartucho Dionex OnGuard II H atraparía cualquier plata que pudiera haberse lixiviado del cartucho Ag y otros cationes encontrados en la muestra. El método demostró tener una buena precisión con una RSD < 0,2 % y < 5 % (n=9) para el tiempo de retención y el área de pico, respectivamente. Las recuperaciones del homogeneizado de carne y de la muestra de espinacas en suspensión oscilaron entre el 89 y el 100%.
23. Coviello *et al.* 2020¹⁴ hicieron un buen resumen afirmando que durante los últimos 15 años, se han descrito en la literatura numerosos métodos para la separación y detección de nitrito y (o) nitrato basados en técnicas espectrofotométricas, quimioluminiscentes, electroquímicas, cromatográficas, electroforéticas capilares, espectrofluorimétricas y electroquimioluminiscentes. Sin embargo, los métodos espectrofotométricos están sujetos a diversas interferencias y a la falta de selectividad. En cuanto a los métodos cromatográficos, la cromatografía de gases necesitaría una reacción de derivación tanto del nitrito como del nitrato, y la cromatografía de líquidos ocultaría el riesgo de oxidación de los nitritos, principalmente cuando se utiliza un medio ácido. La cromatografía iónica (IC) acoplada a la detección por conductividad (CD) ofrecería una buena reproducibilidad y una sensibilidad y selectividad elevadas. Se trata de un resultado muy diferente a los criterios de extracción de datos utilizados por Zhong *et al.* 2021¹.

CONCLUSIÓN

24. Debe recordarse que el CCMAS está proporcionando criterios de rendimiento de los métodos, y que puede utilizarse cualquier método validado que pueda cumplir esos criterios con el producto y la disposición.
25. Como ya se ha indicado, existen algunos métodos normalizados que podrían cumplir los criterios (aunque se necesitarán más datos de validación); no obstante, con la actualización de las técnicas existentes, el porcentaje de conformidad mediante métodos normalizados podría aumentar considerablemente. Intentar conseguir un único sistema analítico para determinar el nitrito y el nitrato individualmente y cumplir todos los criterios actuales de productos y disposiciones sería un reto, pero no necesariamente inalcanzable.
26. Además, con una gama adecuada de materiales de referencia certificados y otros QA y QC, junto con una limpieza adecuada de los extractos, los esquemas de determinación basados en IC/CD, espectroscopia con FIA/SFA automatizados, o CE podrían proporcionar técnicas disponibles y prácticas para el control rutinario con el LD/LC, precisión y exactitud requeridos.

RECOMENDACIÓN

27. Se invita al CCMAS a que, en su 43.^a reunión:
 - i. considere las conclusiones destacadas en este informe en su debate sobre la respuesta a las peticiones de la CCFA, y
 - si se aprueban los criterios de rendimiento numéricos, incluidos los métodos de ejemplo del Apéndice 1, en la respuesta al CCFA;

¹² Butt *et al.* 2001, Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography Talanta 55 (4) p789-797

¹³ Aggrawal *et al.* 2020 Simultaneous detn nitrate and nitrite in spinach and meat by ion chromatography Thermo Fisher Appl. note an73450-en

¹⁴ 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

-
- decidir si se necesita más trabajo para obtener y examinar los datos de validación de los métodos incluidos como «ejemplos de métodos aplicables que cumplen los criterios» en el Apéndice 1;
 - restablezca el GTE para revisar los métodos incluidos en el Apéndice 2 con más detalle y determinar si los métodos son adecuados y si cumplen o superan los criterios de rendimiento numéricos.

APÉNDICE I

Del Anexo 2, información sobre los niveles residuales mínimos propuestos para disposiciones representativas en productos lácteos (queso), carne y mariscos, proporcionados por los miembros del GTE del CCFA sobre la *Norma general para los aditivos alimentarios* en respuesta a las solicitudes de comentar la primera y segunda circulares, más criterios de rendimiento del método basados en los límites máximos adoptados o los LM propuestos en el Apéndice 5 de la NGAA en el procesamiento de trámites.

Aditivo alimentario	Subcategoría para la cual se proporciona un valor	LM residual (mg/kg)	Notas	Límites máximos adoptados (CXS 192-1995) o LM propuestos en NGAA Apéndice 5: Disposiciones para nitratos y nitritos en procedimiento de trámite o adoptadas .	Basados en los límites máximos adoptados (CXS 192-1995) o los LM propuestos en NGAA					
					Intervalo mínimo de aplic. (mg/kg)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Precisión (RSD _R (%))	Recuperación (%)	Ejemplos de métodos aplicables que responden a los criterios
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	01.6.4.4 (Processed cheese) *(see note 1)	2	As NO ₂	20 mg/kg as residual NO ₂ ion.	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	1600 mg/kg as residual NO ₃ ion.	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	130 mg/kg as residual NO ₂ ion.	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 (<i>Salmon substitutes, caviar, and other fish roe products</i>)	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)

Nota 1: En el punto anterior, el # de la subcategoría no coincide con la descripción del Anexo 2, ya que la categoría de alimentos nº 01.6.1 es «Queso no madurado»; mientras que la categoría de alimentos nº 01.6.4 es «Queso procesado». Ni el «Queso no madurado» ni el «Queso procesado» cuentan con una especificación adoptada de «Nitrito (como NO₂)» en la norma CXS 192-1995 Revisión 2021.

Nota 2: Se necesita el artículo completo, ya que la información que figura en la versión gratuita no proporciona suficientes datos de validación.

APÉNDICE II

Para revisión: métodos que figuran en CX/FA 21/52/7, Apéndice 5, Anexo 1 con datos de validación actualmente disponible.

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
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	

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
								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.	NO ₂ & NO ₃ 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.	NO ₂ & NO ₃ 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	NO ₂ & NO _x (NO ₃ 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	NO ₂ & NO ₃ individually	5 mg/kg	NA	Repeated trials all	The recoveries of nitrate

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
		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							

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
		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					

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
				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	NO ₂ & NO ₃ 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	NO ₂ & NO ₃ 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.	

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
					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	NO ₃ 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 NO ₂ by Cd column. NO ₂ 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).	NO _x only (unless nitrite quantified and subtracted from NO _x 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 NO ₂ solutions are nearly identical. Thus, NO ₃ or NO ₂ 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	NO ₂ & NO _x (NO ₃ 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

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
		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)	NO ₂ & NO ₃ 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							

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
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	NO ₂ only.	No validation data.			
36	EU	ISO 4099:1984 Cheese -- Determination of nitrate and nitrite contents -- Method by cadmium reduction and Photometry (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)							
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	NO ₂ & NO ₃ 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

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
								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.	NO ₂ & NO ₃ 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

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
		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.	NO ₂ & NO ₃ 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)

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
			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.	NO ₂ & NO ₃ 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	NO ₂ & NO ₃ individually	LOD for nitrite corresponding to a		Reproducibility of the method for six	Four cured meat products and four

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
		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 NO ₂ , and 2.54 %RSD for NO ₃ .	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	NO ₂ & NO ₃ (NO ₃ 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% NO ₂ recovery, & 110-94% NO ₃ 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.	NO ₂ & NO ₃ 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 NO _x from various fortified

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
		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	NO ₂ & NO _x (NO ₃ 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.	NO ₂ & NO _x (NO ₃ 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 –			

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
		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(Tsikis 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	NO ₂ (by FIA) & NO ₃ (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	NO ₂ & NO _X (NO ₃ by subtraction)	Detection limit for NaNO ₂ was 3 mgkg ⁻¹ and for NaNO ₃ 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 NO ₂ & between 2	

Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
								and 5% for NO ₃ .	
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 (NO ₃), nitrite (NO ₂), 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	NO ₂ & NO _X (NO ₃ by subtraction)			See ISO 14673-1 IDF 189-1: 2004 section 11 for precision	


Línea #	Miembro /Observador	Referencia al método	Principio	Ámbito de la matriz	NO ₂ y NO ₃ en forma individual o combinada	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)	Precisión	Recuperación
			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.	NO ₂ & NO ₃ (NO ₃ 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.	NO ₂ & NO ₃ (NO ₃ 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.	


Índice:

IC-Cond.: Cromatografía iónica con supresión química de la conductividad del eluyente.

Colorimetry – NED: Método colorimétrico - reacción de diazotización-acoplamiento de sulfanilamida con dihidrocloruro de N-(1-naftil)etilendiamina (NED). Reacción de Griess.

NA No disponible.

 Esta referencia no es considerada adecuada para seguir siendo estudiada.

 Esta referencia está repetida y por ello consolidada bajo una línea de referencia.