

Сергей Владимирович Глазков

Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории качества и безопасности пищевой продукции, Видное, Московская область, Россия
s.glazkov@outlook.com

Дмитрий Сергеевич Якубик

Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, научный сотрудник лаборатории качества и безопасности пищевой продукции, Видное, Московская область, Россия
test@vniitek.ru

Артем Владимирович Самойлов

Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, заведующий лабораторией качества и безопасности пищевой продукции, кандидат биологических наук, Видное, Московская область, Россия
molgen@vniitek.ru

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРАТОВ В СВЕЖИХ ОВОЩАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ САЛИЦИЛАТА НАТРИЯ

Цель исследования – валидация спектрофотометрического метода определения нитрат-ионов в овощах с применением салицилата натрия в качестве нитрующего реагента с применением метода твердофазной экстракции на ионообменном картридже SAX. Задачи исследования: подбор условий твердофазной экстракции; оценка линейности и стабильности градуировочной зависимости; сравнение полученных результатов с контрольным методом ВЭЖХ. Приведены результаты разработки доступного и относительно простого спектрофотометрического метода определения нитратов в свежих овощах с применением реагента на основе салицилата натрия. Исследования были основаны на колориметрической реакции электрофильного замещения (нитрования) между ионом нитрония NO_2^+ и салицилатом в присутствии серной кислоты, с образованием нитросалициловой кислоты, обладающей устойчивой желтой окраской при $\text{pH} > 7$. С целью очистки пробы от влияния растворимых красителей и углеводов и концентрирования использовалась твердофазная экстракция на ионообменном сорбенте SAX. Предел обнаружения нитратов составил 18 мкг с линейным диапазоном до 1 мг при использовании объема пробы 5–10 см³. Содержание нитратов (медиана) по данному методу составило от 8 до 94 мг/кг в различных видах овощей. Результаты для каждой группы измерений имели высокую степень корреляции в сравнении с данными, полученными методом ВЭЖХ для тех же образцов. Степень нахождения добавки в среднем составила 108 % от расчетного. Параметры линейной модели оценивали методом наименьших квадратов. Статистическая значимость уравнения проверена с помощью коэффициента детерминации R^2 и критерия Фишера. Таким образом, подтверждена высокая прецизионность результатов, что может быть успешно использовано для измерения содержания нитратов в овощах в широком диапазоне, давая при этом сопоставимые значения с методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: безопасность пищевой продукции, нитраты, спектрофотометрический метод, свежие овощи, салицилат натрия.

Sergey V. Glazkov

All-Russian Research Institute of Canning Technology – a branch of the Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbатов RAS, Leading Researcher, Laboratory of Food Quality and Safety, Vidnoe, Moscow Region, Russia
s.glazkov@outlook.com

Dmitry S. Yakubik

All-Russian Research Institute of Canning Technology – a branch of the Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbатов RAS, Researcher, Laboratory of Food Quality and Safety, Vidnoe, Moscow Region, Russia
test@vniitek.ru

Artem V. Samoilov

All-Russian Research Institute of Canning Technology – a branch of the Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbатов RAS, Head of the Laboratory of Quality and Food Safety, Candidate of Biological Sciences, Vidnoe, Moscow Region, Russia
molgen@vniitek.ru

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD TO DETERMINE NITRATES IN FRESH VEGETABLES USING SODIUM SALICYLATE REAGENT

The aim of the study is to validate the spectrophotometric method for the determination of nitrate ions in vegetables using sodium salicylate as a nitrating reagent using the method of solid-phase extraction on the SAX ion exchange cartridge. Research objectives: selection of conditions for solid-phase extraction; evaluation of the linearity and stability of the calibration dependence; comparison of the obtained results with the control HPLC method. The paper presents the results of the development of an accessible and relatively simple spectrophotometric method for the determination of nitrates in fresh vegetables using a reagent based on sodium salicylate. The studies were based on the colorimetric reaction of electrophilic substitution (nitration) between the nitronium ion NO_2^+ and salicylate in the presence of sulfuric acid, with the formation of nitrosalicylic acid, which has a stable yellow color at $\text{pH} > 7$. In order to purify the sample from the influence of soluble dyes and carbohydrates and concentrate, solid-phase extraction on a SAX ion-exchange sorbent was used. The detection limit for nitrates was $18 \mu\text{g}$ with a linear range of up to 1 mg using a sample volume of $5\text{--}10 \text{ cm}^3$. The nitrate content (median) according to this method ranged from 8 to 94 mg/kg in various types of vegetables. The results for each group of measurements had a high degree of correlation in comparison with the data obtained by the HPLC method for the same samples. The degree of finding the additive averaged 108% of the calculated one. The parameters of the linear model were estimated by the least squares method. The statistical significance of the equation was tested using the coefficient of determination R^2 and Fisher's test. Thus, the high precision of the results was confirmed, which can be successfully used to measure the content of nitrates in vegetables in a wide range, while giving values comparable with the method of high performance liquid chromatography.

Keywords: food safety, nitrates, spectrophotometric method, fresh vegetables, sodium salicylate.

Введение. Нитраты – это соли азотной кислоты, имеющие в составе молекулы ион NO_3^- . Нитраты широко распространены в растительных объектах, являясь их основным питательным элементом за счет легкоусвояемого водорастворимого азота. Внесение в почву минеральных удобрений с целью ускорения роста и увеличения урожайности культур, вид овощей и условия вегетации в значительной степени влияют на содержание нитратов в них [1, 2].

Нитраты оказывают токсическое воздействие на организм человека, вызывая метгемоглобинемию, а под воздействием кислой среды и микрофлоры желудка восстанавливаются до нитритов NO_2^- , в значительной степени более токсичных и способных к образованию канцерогенных нитрозаминов [3, 4]. Страны Европейского союза приняли регламент комиссии ЕС, устанавливающий максимальные уровни нитратов в некоторых овощах и продуктах их переработки [5].

Для определения нитратов в различных объектах окружающей среды и пищевых продуктах на сегодняшний день широкое распространение в практике нашло несколько основных методов. Так, в питьевой воде определение проводят спектрофотометрически с 2,6-диметилфенолом [6], сульфосалициловой кислотой [7], восстановлением до комплекса фосфомолибденового синего [8], салицилатом натрия [9, 10], хромотроповой кислотой [11], 2,4-ксиленолом [12, 13], 2-аминобензойной кислотой, кадмиево-медной колонкой [14]. Для пищевых продуктов наиболее широко применяется спектрофотометрический метод определения нитратов, с предварительным восстановлением их до нитритов на кадмиевой колонке, образующих затем ярко-окрашенное диазосоединение с максимумом поглощения в видимой области 535–540 нм, стандартизированный в международных стандартах для молока [15], мяса [16], фруктов, овощей и продуктов их переработки [17]. Однако данный подход требует значительных затрат времени при рутинных определениях, использования токсичного металлического кадмия и контроля эффективности его восстанавливающей способности. Потенциометрическое определение с помощью ионоселективного электрода – достаточно простой способ, который позволяет избежать использование опасных реагентов, но, к сожалению, не дает сопоставимых результатов с другими методами, ввиду значительной систематической погрешности, связанной с влиянием сложного ионного состава образца, особенно в области низкого содержания нитратов, и может использоваться лишь для ориентировочной оценки уровня нитратов в овощах [18–20].

В последнее время для определения нитратов в овощах все большее распространение получает метод жидкостной хроматографии, отличительной особенностью которого является быстрота и простота подготовки образца для определения, высокая чувствительность и селективность за счет определения в ультрафиолетовой области спектра, позволяющая определить даже следовые количества нитратов на уровне 1 мг/кг [21–24], однако данный метод требует использования сложного дорогостояще-

го оборудования и соответствующей квалификации персонала, что не всегда оправдано при проведении рутинных испытаний, особенно при контроле входящего сырья на перерабатывающих производствах.

Представлен подход, основанный на известной реакции нитрования салицилата натрия в присутствии серной кислоты, с образованием соли нитросалициловой кислоты, имеющей в щелочной среде желтую окраску, интенсивность которой определяют фотометрически [10]. Спектрофотометры широко распространены в различных агрохимических лабораториях, благодаря их относительно невысокой стоимости, простоте измерения и высокой чувствительности.

В данном исследовании поставлены задачи по изучению процедуры экстракции и очистки проб с целью удаления из них углеводов и красящих веществ природного происхождения; стабильности окраски полученных растворов и сравнению полученных результатов с контрольным методом. В качестве смешанного салицилатного реагента использовался раствор, состоящий из 1 % салицилата натрия с добавлением сульфаминовой кислоты с целью разложения мешающих определению нитрит-ионов NO_2^- .

Цель исследования – валидация спектрофотометрического метода определения нитрат-ионов в овощах с применением салицилата натрия в качестве нитрующего реагента с применением метода твердофазной экстракции на ионообменном картридже SAX.

Задачи исследования: подбор условий твердофазной экстракции; оценка линейности и стабильности градуировочной зависимости; сравнение полученных результатов с контрольным методом ВЭЖХ.

Объекты и методы исследования

1. Объекты исследований

В качестве проб использовали свежие огурцы, редьку, болгарский перец, картофель, репчатый лук, кабачки, приобретенные в торговой сети (Россия, зимний период, январь 2021 г.), очищенные от несъедобной части и измельченные на гомогенизаторе GM 200 (Retsch, Германия) до гомогенного однородного состояния. Пробы хранили при температуре 2–4 °С в холодильнике.

Реактивы и стандарты

Салицилат натрия (Sigma 71945), сульфаминовая кислота (Sigma 24277-2), серная кислота (112080 Supelco), гидроксид натрия (106469 Supelco), октиламин (Sigma 05802), ортофосфорная кислота 85 % (EMSURE 1.00573), метанол (LiChrosolv 1.06018) isocratic grade, сульфат натрия (EMSURE 1.06649).

Исходный стандартный раствор с массовой долей нитратов 10 % готовили растворением 10,0 г нитрата калия (105063 Supelco) в 100 см³ воды. Смешанный окрашивающий реактив готовили, смешивая 1,0 г салицилата натрия и 0,1 г сульфаминовой кислоты в 100 см³ воды.

2. Экстракция нитратов из пробы

Взвешивали 5 г измельченной пробы овощей на весах LA 620 (Sartorius, Германия) с точностью до 0,01 г и количественно переносили с помощью 50 см³ деионизированной водой температурой 60 °С в мерную колбу вместимостью 100 см³. Полученный раствор фильтровали через складчатый бумажный фильтр MN 418 (Macherey-Nagel, Германия), согласно процедуре, описанной в [25].

Фильтрат объемом от 1 до 5 см³ очищали на картридже SAX (Agilent, США), затем элюировали 5 см³ раствора сульфата натрия Na₂SO₄ 0,5 моль/дм³. Полученный элюат использовали для дальнейших определений. Данный объем был выбран в связи с тем, что при меньшем количестве развитие окраски было недостаточно интенсивно, а при большем объеме увеличивалось время выпаривания.

3. Спектрофотометрическое определение

К фильтрату после очистки на картридже прибавляли 1 см³ смешанного окрашивающего реактива и выпаривали досуха на кипящей водяной бане. Сухой остаток подвергали реакции нитрования в присутствии серной кислоты [9]. Одновременно готовили контрольный раствор с теми же реактивами.

Построение градуировочной зависимости проводили, используя растворы сравнения, приготовленные из стандартного раствора нитрата калия, с массовой долей 10 %, с содержанием нитратов, соответствующих по массе 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; и 1,0 мг [9]. Через 15 мин измеряли оптическую плотность полученных растворов по отношению к контрольному раствору на спек-

трофотометре Cary UV-100 (Agilent, Австралия) при длине волны 410 нм в кюветах из прозрачного пластика с толщиной 10 мм (Brand, Германия). С целью оценки стабильности окраски градуировочных растворов проводили повторные измерения оптической плотности в течение трех дней (через каждые сутки). Обработку полученных данных и построение графика зависимости оптической плотности от концентрации проводили с помощью программного обеспечения Cary WinUV 3.0 (Agilent, Австралия), методом наименьших квадратов.

4. ВЭЖХ определение

Очищенный на картридже фильтрат также использовали для определения стандартным методом [26]. Определения проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 (Shimadzu, США), состоящем из насоса LC-20AD, автосамплера SIL-20A, спектрофотометрического детектора SPD-20A, обработку хроматограмм и построение градуировочной зависимости выполняли с помощью программного обеспечения Shimadzu LC Solution 2.0. Для разделения нитратов использовали колонку Hypersil GOLD, длина 150 мм, диаметр 3 мм (Thermo Fisher, США), с неподвижной фазой C₁₈ (включая предколонку). Объем инъекции – 10 мм³. В качестве подвижной фазы использовали смесь 0,01 М раствора ортофосфата октиламина pH (7,0±0,5) и метанола в соотношении 1:1, скорость потока 1,5 см³/мин, температура 35 °С, в изократическом режиме, в течение 15 мин, детектирование при длине волны 210 нм. Время удерживания нитрата составило 6,78 мин. Перед определением фильтрат пропускали через мембранный фильтр Minisart 0,45 мкм, Nylon (Sartorius, Германия) в виалу. Определения проводились в тот же день, что и на спектрофотометре. Для построения градуировочной зависимости использовали стандартные растворы нитрата калия с содержанием нитратов 1; 10; 25; 50 мг/дм³, по 2 параллельных измерения на каждый уровень.

С целью оценки воспроизводимости результатов во всем линейном диапазоне и степени нахождения нитратов для обоих методов использовали добавки стандартного раствора нитрата калия к фильтрату. Результаты измерений представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1

**Результаты измерений содержания нитратов в свежих овощах
из торговой сети двумя методами**

Образец	Содержание, мг/кг (среднее значение повторных определений $n = 6$)	Относительное стандартное отклонение, СКО, %
Кабачки	829 ^a ± 190	0,40
	847 ^b ± 101	4,93
Лук	249 ^a ± 57	3,17
	345 ^b ± 41	10,56
Картофель	513 ^a ± 118	5,71
	520 ^b ± 62	7,22
Редька	950 ^a ± 218	2,39
	1082 ^b ± 129	3,32
Огурцы	32 ^a ± 7	8,98
	42 ^b ± 5	9,75
Болгарский перец	139 ^a ± 32	9,74
	147 ^b ± 17	2,47

^a Метод с применением салицилата натрия.

^b Стандартный метод ВЭЖХ.

Таблица 2

**Результаты измерений содержания нитратов в овощах
с добавкой стандартного раствора нитрата калия спектрофотометрическим методом**

Образец	Начальное содержание, мг/кг	Полученное содержание ^a , мг/кг	Найдено, %
Кабачки	829 ± 190	1659 ± 381	104
Лук	249 ± 57	600 ± 138	116
Картофель	513 ± 118	1029 ± 236	99
Редька	950 ± 218	1974 ± 454	103
Огурцы	32 ± 7	78 ± 17	118
Болгарский перец	139 ± 32	336 ± 77	111
Среднее значение			109

^a Внесено 100 % от исходного содержания, среднее значение повторных определений $n = 6$.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты по оценке стабильности градуировочных растворов для спектрофотометрического определения представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты измерений оптической плотности растворов при $\lambda = 410$ нм

Масса нитрата, мг	Оптическая плотность						
	Часы				Среднее значение	Стандартное отклонение ±SD	Размах ΔD
	0	24	48	72			
					$n = 4$		
0,050	0,0828	0,0967	0,0810	0,0842	0,0862	0,0071	0,0157
0,100	0,1822	0,1960	0,1768	0,1750	0,1825	0,0095	0,0210
0,250	0,4969	0,5415	0,4968	0,5003	0,5089	0,0218	0,0447
0,500	0,9819	0,9830	0,9912	0,9781	0,9836	0,0055	0,0131
1,000	1,7252	1,7343	1,7282	1,7298	1,7294	0,0038	0,0091

Как видно из полученных значений, на вторые и последующие сутки нет значительной разницы между оптическими плотностями растворов, что говорит о их высокой стабильности.

Результаты построения градуировочной зависимости с использованием соответствующих растворов представлены на рисунке 1. Также были рассчитаны основные параметры метода (табл. 4).

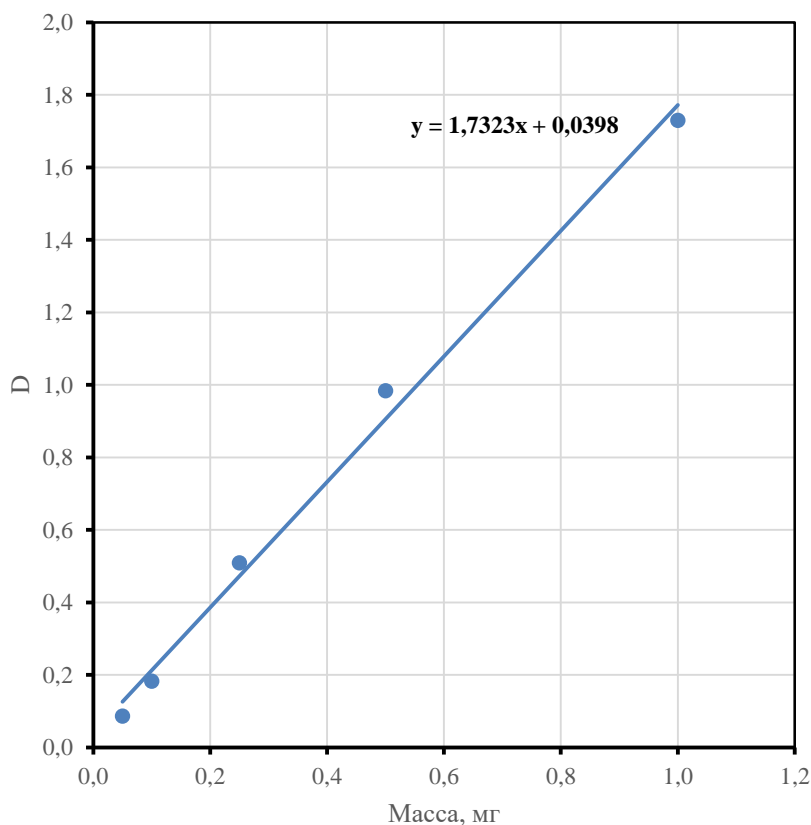


Рис. 1. Градуировочная кривая для спектрофотометрического метода

Таблица 4

Основные характеристики метода определения нитратов при $\lambda = 410$ нм

Показатель	Значение
Линейный диапазон определяемых масс, мг	0,05–1,0
Уравнение градуировочного графика	$y = 1,7323 \cdot x + 0,0398$
Коэффициент корреляции, $n = 3$	$r^2 = 0,9968$
Предел обнаружения, мг ($LOD = 3,3 \cdot S/a$)	0,018
Предел определения, мг ($LOQ = 10 \cdot S/a$)	0,055

Для метода ВЭЖХ проводили построение графика зависимости площади пика от уровня с применением метода наименьших квадратов, основные параметры метода были рассчитаны на его основе (рис. 2, табл. 5).

С целью сравнения двух групп данных, полученных при измерении 36 образцов, осуще-

ствляли их обработку с применением модели линейной регрессии $y = ax + b$ при уровне доверительной вероятности $P = 0,95$ (рис. 3). Проверку значимости уравнения линейной регрессии проводили с помощью программного пакета MS Excel, используя дисперсионный анализ (ANOVA).

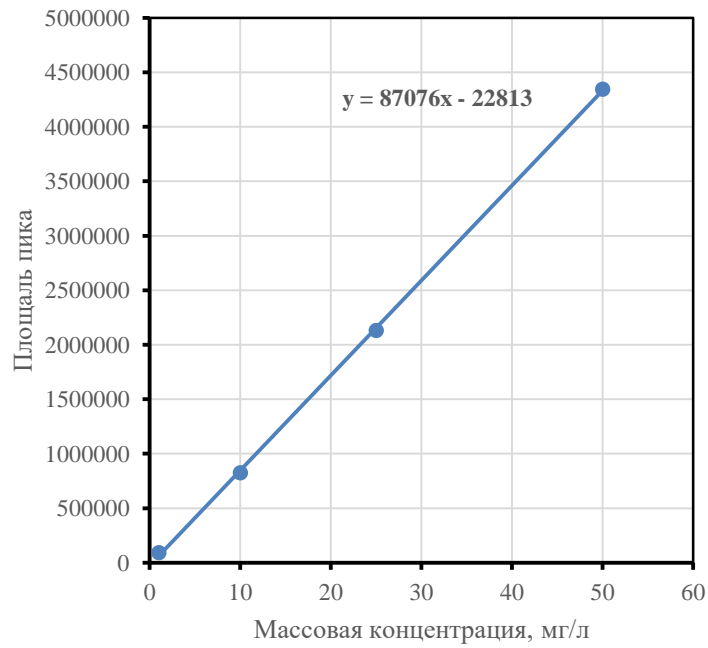


Рис. 2. Градуировочная кривая для метода ВЭЖХ

Таблица 5

Основные характеристики метода определения нитратов при $\lambda = 210$ нм

Показатель	Значение
Линейный диапазон определяемых концентраций, мг/л	1,0–50,0
Уравнение градуировочного графика	$y = 87076 \cdot x - 22813$
Коэффициент корреляции, $n = 3$	$r^2 = 0,9999$
Предел обнаружения, мг ($LOD = 3,3 \cdot S/a$)	0,114
Предел определения, мг ($LOQ = 10 \cdot S/a$)	0,345

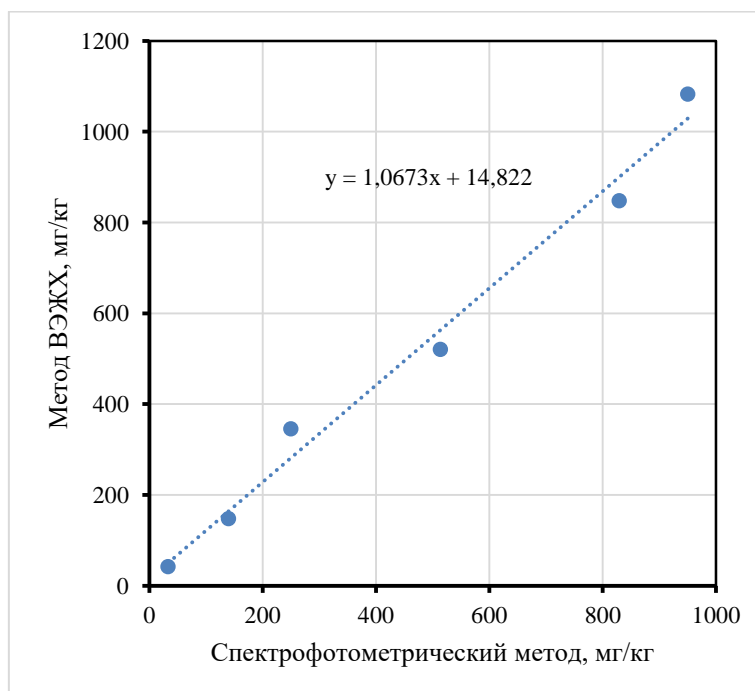


Рис. 3. Графическая зависимость результатов измерений двумя методами

Регрессионный анализ методом наименьших квадратов показал, что обе группы результатов хорошо согласуются между собой и описываются уравнением линейной зависимости $y = 1,0673x + 14,822$ с высоким коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9855$. Учитывая, что коэффициент уравнения $b > 0$, это означает, что связь между двумя методами прямая. Дополнительно проводили оценку значимости коэффициентов a и b с помощью t -критерия Стьюдента. Полученное значение $t_b = 67,75$ больше табличного 2,29, что говорит о значимости данного коэффициента; значение $t_a = 1,66$ меньше табличного 2,29, статистическая значимость этого коэффициента регрессии не подтверждается.

Заключение. Большинство используемых в настоящее время методов определения нитратов являются медленными и сложными в исполнении либо требуют дорогостоящего оборудования. Был предложен метод, который может быть использован в лабораториях с ограниченными ресурсами при сохранении необходимой чувствительности и точности. На основе описанной в литературе процедуры, с применением салицилата натрия в качестве нитрующего реагента были сопоставлены полученные результаты со стандартным методом.

Список источников

1. *Gangolli SD, Van Den Brandt PA, Feron VJ* (1994). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology* 292: 1–38.
2. *Shokrzadeh M, Shokravie M, Saeedi Saravi SS* (2007). The measurement of nitrate and nitrite content in leek and spinach sampled from central cities of Mazandaran State of Iran. *World Applied Sciences Journal* 2: 121–124.
3. *Shao-ting DU, Yong-song Z, Xian-yong L* (2007). Accumulation of Nitrate in Vegetables and Its Possible Implications to Human Health. *Agricultural Sciences in China* 6 (10): 1246–1255.
4. *Thomas YK* (2011). Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinemia. *Toxicology Letters* 200: 107–108.
5. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance).
6. ISO 7890-1 (1986). Water quality. Determination of nitrate Part 1: 2,6-Dimethylphenol spectrometric method.
7. ISO 7890-3 (1988) Water quality. Determination of nitrate Part 3: Spectrometric method using sulfosalicylic acid.
8. *Zatar NA, Abu – Eid MA, Eid AF* (1999). Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate using phosphomolybdenum blue complex. *Talanta* 50: 819–826.
9. *Monteiro MIC, Ferreira FN, Oliveira NMM, Ávila AK* (2003). Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Analytica Chimica Acta* 477: 125–129
10. *Yang JE, Skogley EO, Schaff BE, Kirn JJ* (1998). A Simple Spectrophotometric Determination of Nitrate in Water, Resin, and Soil Extracts.
11. *West PW, Ramachandran TP* (1966). Spectrophotometric determination of nitrate using chromotropic acid. *Received January* 35: 317–324.
12. *Norwith G, Gordon H* (1977). An improved technique for the spectrophotometric determination of nitrate with 2,4 – xyleneol. *Analytica Chimica Acta* 89: 177–187;
13. *Hatcher DW, Schall ED* (1965). Determination of Nitrate in Feeds. *Journal of the A.O.A.C.* 48: 648–653.
14. *Wang GF, Satake M, Horita K* (1998). Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in water and some fruit samples using column preconcentration. *Talanta* 46: 671–678.
15. ISO 14673-1:2004. [IDF 189-1:2004] Milk and milk products – Determination of nitrate and nitrite contents. Part 1: Method using cadmium reduction and spectrometry.
16. ISO 3091:1975. Meat and meat products. Determination of nitrate content (Reference method).
17. ISO 6635:1984. Fruits, vegetables and derived products. Determination of nitrite and nitrate content — Molecular absorption spectrometric method.
18. *João RS, João LM, José LFC* (2010). Single interface flow system with potentiometric detection for the determination of nitrate in water and vegetables. *Talanta* 80: 1326–1332.
19. *Hassan SSD* (1981). New atomic-absorption spectrometric, potentiometric and polarogra-

- phic methods for the determination of nitrates. *Talanta* 28: 89–93.
20. *Consalter A, Rigato A, Clamor L, Giandon P* (1992). Determination of Nitrate in Vegetables Using an Ion-Selective Electrode. *Journal of food composition and analysis* 5: 252–256.
 21. *Shin-shou C, Jen-chien C, Deng-fwu H* (2003). A High Performance Liquid Chromatography Method for Determining Nitrate and Nitrite Levels in Vegetables. *Journal of Food and Drug Analysis* 11: 233–238.
 22. *Cheng CF, Tsang CW* (2009). Simultaneous determination of nitrite, nitrate and ascorbic acid in canned vegetable juices by reverse-phase ion-interaction HPLC. *Food Additives & Contaminants*.
 23. *Dennis MJ, Key PE, Papworth T, Pointer M, Massey RC* (2009). The determination of nitrate and nitrite in cured meat by HPLC/UV.
 24. ISO 10304-1:2007. Water quality. Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions. Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate.
 25. *Samoilov A.V., Suraeva N.M., Koptsev S.V., Glazkov S.V.* Developing the methods of food preservatives extraction from complex matrices for bioassay purpose. *Food systems*. 2019;2(4):31-33. DOI: 10.21323/2618-9771-2019-2-4-31-33.
 26. 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.
 4. *Thomas YK* (2011). Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinemia. *Toxicology Letters* 200: 107–108.
 5. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance).
 6. ISO 7890-1 (1986). Water quality. Determination of nitrate Part 1: 2,6-Dimethylphenol spectrometric method.
 7. ISO 7890-3 (1988) Water quality. Determination of nitrate Part 3: Spectrometric method using sulfosalicylic acid.
 8. *Zatar NA, Abu – Eid MA, Eid AF* (1999). Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate using phosphomolybdenum blue complex. *Talanta* 50: 819–826.
 9. *Monteiro MIC, Ferreira FN, Oliveira NMM, Ávila AK* (2003). Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Analytica Chimica Acta* 477: 125–129
 10. *Yang JE, Skogley EO, Schaff BE, Kirn JJ* (1998). A Simple Spectrophotometric Determination of Nitrate in Water, Resin, and Soil Extracts.
 11. *West PW, Ramachandran TP* (1966). Spectrophotometric determination of nitrate using chromotropic acid. Received January 35: 317–324.
 12. *Norwith G, Gordon H* (1977). An improved technique for the spectrophotometric determination of nitrate with 2,4 – xyleneol. *Analytica Chimica Acta* 89: 177–187;
 13. *Hatcher DW, Schall ED* (1965). Determination of Nitrate in Feeds. *Journal of the A.O.A.C.* 48: 648–653.
 14. *Wang GF, Satake M, Horita K* (1998). Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in water and some fruit samples using column preconcentration. *Talanta* 46: 671–678.
 15. ISO 14673-1:2004. [IDF 189-1:2004] Milk and milk products – Determination of nitrate and nitrite contents. Part 1: Method using cadmium reduction and spectrometry.
 16. ISO 3091:1975. Meat and meat products. Determination of nitrate content (Reference method).
 17. ISO 6635:1984. Fruits, vegetables and derived products. Determination of nitrite and nitrate

References

1. *Gangolli SD, Van Den Brandt PA, Feron VJ* (1994). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology* 292: 1–38.
2. *Shokrzadeh M, Shokravie M, Saeedi Saravi SS* (2007). The measurement of nitrate and nitrite content in leek and spinach sampled from central cities of Mazandaran State of Iran. *World Applied Sciences Journal* 2: 121–124.
3. *Shao-ting DU, Yong-song Z, Xian-yong L* (2007). Accumulation of Nitrate in Vegetables and Its Possible Implications to Human Health. *Agricultural Sciences in China* 6 (10): 1246–1255.

- content — Molecular absorption spectrometric method.
18. *João RS, João LM, José LFC* (2010). Single interface flow system with potentiometric detection for the determination of nitrate in water and vegetables. *Talanta* 80: 1326–1332.
 19. *Hassan SSD* (1981). New atomic-absorption spectrometric, potentiometric and polarographic methods for the determination of nitrates. *Talanta* 28: 89–93.
 20. *Consalter A, Rigato A, Clamor L, Giandon P* (1992). Determination of Nitrate in Vegetables Using an Ion-Selective Electrode. *Journal of food composition and analysis* 5: 252–256.
 21. *Shin-shou C, Jen-chien C, Deng-fwu H* (2003). A High Performance Liquid Chromatography Method for Determining Nitrate and Nitrite Levels in Vegetables. *Journal of Food and Drug Analysis* 11: 233–238.
 22. *Cheng CF, Tsang CW* (2009). Simultaneous determination of nitrite, nitrate and ascorbic acid in canned vegetable juices by reverse-phase ion-interaction HPLC. *Food Additives & Contaminants*.
 23. *Dennis MJ, Key PE Papworth T, Pointer M, Massey RC* (2009). The determination of nitrate and nitrite in cured meat by HPLC/UV.
 24. ISO 10304-1:2007. Water quality. Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions. Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate.
 25. *Samoilov A.V., Suraeva N.M., Koptsev S.V., Glazkov S.V.* Developing the methods of food preservatives extraction from complex matrices for bioassay purpose. *Food systems*. 2019;2(4):31-33. DOI: 10.21323/2618-9771-2019-2-4-31-33.
 26. 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.

