

DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS POR HPLC DE PAR IÓNICO

DETERMINATION OF NITRITES AND NITRATES IN MEAT PRODUCTS BY ION-PAIR CHROMATOGRAPHY

Enrique Fabián Flores, Rodrigo Zalazar, Pablo Ayala, Laura Hernaez, Liliana Figueroa y Marcelo Bello
(DILAB - APAC - Departamento de Evaluación y Desarrollo - Senasa, Argentina)

Resumen

Los nitritos y nitratos se agregan a los productos cárnicos como agentes antimicrobianos y para otorgar características organolépticas distintivas. Con el objeto de dar cumplimiento a la legislación vigente, se desarrolló y validó un método de cromatografía líquida de alta performance de par iónico para el análisis de estos aditivos.

Los parámetros de validación evaluados para el análisis mostraron, en general, la aptitud del método para los fines previstos. La linealidad presentó valores de coeficiente de variación porcentual menores al 4 % en todos los casos. La reproducibilidad interna fue menor al 13 % para ambos analitos en todos los niveles de fortificación. La metodología presentó un mínimo nivel detectable de 6 mg/kg y 14,5 mg/kg para nitrito y nitrato, respectivamente. Los niveles de incertidumbre estimados se encontraron en el orden del 17 % para ambos analitos.

Del análisis de los resultados se puede concluir que este método se presenta como una alternativa a las metodologías de referencia actuales, con un análisis rápido y sencillo que permite dar cumplimiento a las exigencias de la legislación para este tipo de alimentos, con un alto grado de exactitud y reproducibilidad.

Palabras clave: nitritos, nitratos, HPLC, validación, par iónico.

Abstract

Nitrites and nitrates are added to meat products as antimicrobial agents and to give distinctive organoleptic characteristics. In order to comply with the legislation, it was developed and validated a method of ion-pair liquid chromatography for the analysis of these additives.

Validation parameters evaluated in this method showed in general, the goodness for purpose. The linearity presented values of percentage variation coefficient less than 4 % in all cases. The internal reproducibility was less than 13 % for both analytes in all levels of fortification. The methodology presented a minimum detectable level of 6 mg/kg and 14,5 mg/kg for nitrite and nitrate, respectively.

Uncertainty levels estimates are found in the order of the 17 % for both analytes.

The analysis of the results it can be concluded that this method is presented as an alternative to the current reference methodologies, with a quick and easy test that allows to comply with the legislation requirements for this food, with a high degree of accuracy and reproducibility.

Keywords: nitrites, nitrates, HPLC, validation, ion pair.

Introducción

Los nitratos y nitritos son utilizados en el procesamiento de productos cárnicos por su acción antimicrobiana y para otorgar al producto características organolépticas distintivas. La legislación permite el agregado de sales de sodio y potasio en estos productos con el objeto de prevenir el crecimiento de distintos microorganismos como el *Clostridium botulinum*, productor de la toxina botulínica responsable de la enfermedad conocida como botulismo, que se caracteriza por provocar parálisis muscular, entre otras complicaciones neurológicas (Cammack et ál., 1999).

Asimismo, el nitrito es ampliamente utilizado en la industria frigorífica por su capacidad para reaccionar con la mioglobina de la carne y generar nitrosomioglobina, molécula termoestable que otorga el color rojo característico de la carne curada aun en productos tratados a temperaturas cercanas a los 120 °C. Esta coloración estable con la temperatura se ve alterada por el deterioro microbiano o la oxidación de lípidos, lo que otorga al consumidor una

importante herramienta para detectar la pérdida de calidad y vida útil de un producto cárnico en particular (Honikel, 2008). En la Figura 1, pueden observarse las distintas reacciones de formación de pigmentos debido a los procesos sufridos tanto durante el agregado de dichos aditivos como durante la conservación de los productos en cuestión.

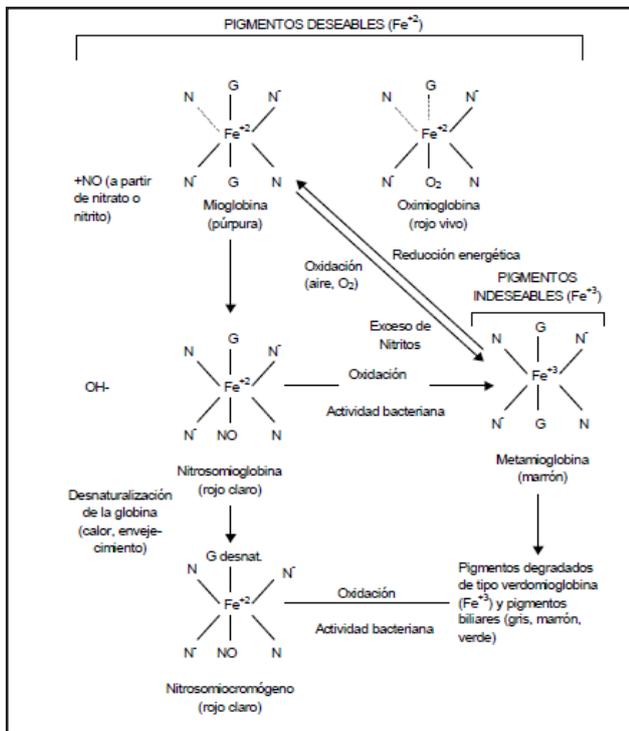


Figura 1: Reacciones de formación de pigmentos característicos de productos cárnicos curados (García Roche et ál., 1994).

Honikel (2008) describe el agregado de nitrato como precursor del nitrito por reducción de enzimas microbianas, que asegura la acción de este último en tiempos más extensos durante la conservación del producto cárnico.

La ingesta en exceso de ambos aditivos, en particular del nitrito –de considerable mayor grado de toxicidad que el nitrato–, puede provocar riesgos para la salud debido a reacciones con la hemoglobina para la formación de metahemoglobina y derivar en un proceso de cianosis (Anton et ál., 2001). Su agregado se encuentra regulado en este tipo de productos de manera de asegurar las ventajas tecnológicas sin afectar la salud del consumidor.

El Reglamento 1129/11 de la Unión Europea establece, tanto para el nitrito como para el nitrato, límites comprendidos entre los 50 y 300 mg/kg dependiendo del tipo de producto cárnico. En nuestro país, el Código Alimentario Argentino, en su Capítulo VI, establece para conservas, salazones y chacinados (artículos 284, 286 y 323 bis, respectivamente) una cantidad residual

máxima expresada como nitrito de sodio de 150 mg/kg de nitrito y de 300 mg/kg para nitrato.

Debido a lo descrito y con el fin de dar cumplimiento a la legislación vigente, se considera necesario el control analítico de estos aditivos en los productos cárnicos de interés.

Los métodos para el análisis de estos aditivos pueden ser secuenciales o simultáneos. La metodología secuencial más empleada contempla la determinación de nitrito antes y después de la reducción del nitrato en columna de Cu/Cd, con posterior reacción colorimétrica por diazotación de una amina aromática, utilizando como reactivos sulfanilamida y N-(1-naphthyl) ethylenediamine y midiendo espectrofotométricamente la formación del compuesto a 540 nm. La determinación del contenido de nitrato se realiza entonces por diferencia en la concentración de nitrito antes y después del paso de reducción descrito (Moorcroft et ál., 2001). Los principales inconvenientes de esta técnica son la cuantificación indirecta del contenido de nitrato, la influencia de la matriz en la recuperación del método y la alta toxicidad de los reactivos utilizados como agentes reductores (Ferreira y Silva, 2008).

La detección electroquímica es una técnica aplicable para la determinación de nitritos y nitratos que presenta baja sensibilidad y reproducibilidad para matrices de alimentos debido a efectos de pasivación de los electrodos (Moorcroft et ál., 2001). Más recientemente, Labrador et ál. (2010) desarrollaron, como metodologías no destructivas, una lengua electrónica voltamétrica y un sensor impedimétrico para la detección predictiva de ambos aditivos en carne feteada con resultados poco robustos. Merusi et ál. (2010) utilizaron la electroforesis capilar para la determinación simultánea de oxalatos, nitratos y nitritos en vegetales.

La determinación cromatográfica de nitrato y nitrito se presenta como una alternativa a las metodologías anteriormente descritas. Tsikas et ál. (1994) desarrollaron una metodología secuencial de derivatización de nitrito con bromuro de pentafluorobencilo y posterior detección por cromatografía gaseosa. En cuanto a la determinación por cromatografía líquida son varias las alternativas que presenta la bibliografía. Bilal Butt et ál. (2001) utilizaron una técnica de cromatografía de par iónico con columna de fase normal y detección UV para el análisis simultáneo de nitrito y nitrato en muestras de espinaca y lechuga. El agente de par iónico utilizado en este caso fue cloruro de tetraetilamonio. Dichos autores encontraron bajas recuperaciones en presencia de cloruro de sodio, motivo por el cual el método no se presenta apto para la determinación en productos cárnicos con concentraciones de sal en algunos casos mayores a 10 %.

Ferreira y Silva (2008) validaron la determinación simultánea de nitritos y nitratos en jamón por cromatografía líquida de par iónico con detección de arreglo de diodos con buenos resultados en cuanto a selectividad, sensibilidad y reproducibilidad. El reactivo de par iónico utilizado en este caso fue sulfato ácido de tetrabutilamonio, trabajando con una columna de fase reversa con un detector UV a una longitud de onda de 215 nm y con una extracción con carbón activado y posterior desproteinización con acetonitrilo.

Más recientemente, Yeh et ál. (2013) y López-Moreno, Viera Pérez y Urbano trabajaron en distintas técnicas de cromatografía iónica para el análisis de nitritos y nitratos en leche y carne, respectivamente. Si bien los resultados obtenidos en estos casos son satisfactorios, la especificidad del equipo y el costo de las columnas utilizadas llevan a la búsqueda de técnicas alternativas que alcancen los mismos objetivos propuestos por caminos más simples.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar una metodología basada en cromatografía líquida de alta performance (HPLC) de fase reversa, utilizando la técnica de par iónico con detección UV para el análisis de nitritos y nitratos en productos cárnicos para su cuantificación en el marco del cumplimiento de la legislación vigente.

Materiales y métodos

Muestras

Para el desarrollo y validación de la metodología fueron utilizadas muestras comerciales de jamón cocido y hamburguesas. La masa total de cada uno de los productos fue homogeneizada en procesadora antes de ser utilizada.

Patrones, reactivos y soluciones

Se utilizaron patrones de nitrito de sodio grado analítico Anedra y nitrato de potasio grado analítico Biopack.

Soluciones acuosas de nitritos y nitratos de concentraciones aproximadas 6,7 mg ion nitrito/ml y 12,3 mg ion nitrato/ml, respectivamente, fueron utilizadas tanto para construir las curvas de calibración como para los distintos niveles de fortificación estudiados.

Como reactivos analíticos fueron utilizados metanol grado HPLC Sintorgan, nitrato de plata grado analítico Biopack y agua de alta pureza tipo I. Bromuro de cetiltetrabutilamonio grado biología molecular Genbiotech fue utilizado como reactivo de par iónico.

Ferrocianuro de potasio trihidratado grado analítico y acetato de zinc grado analítico suministrados por Anedra fueron utilizados para preparar las soluciones I y II de Carrez según método AOAC 980.23 (2014).

Preparación de las muestras

Análisis de nitratos: 5 g de muestra fueron tratados en baño de ultrasonido con agua como solvente de extracción, llevando a un volumen final de 50 ml. Con posterior centrifugación (6000 rpm) y filtración (0,45µ), se obtuvieron los extractos para la inyección en el equipo de HPLC.

Análisis de nitritos: el tratamiento de la muestra es el mismo que para el análisis de nitratos a excepción del agregado de nitrato de plata 0,2N con posterioridad al tratamiento en baño de ultrasonido.

Análisis de las muestras

Para el análisis por HPLC, un equipo Agilent 1200 con inyector automático y detector de arreglo de diodos fue utilizado con las siguientes condiciones de corrida:

Fase móvil: 80 % de solución metanol/agua (1:1) de Bromuro de cetiltetrabutil amonio 0,044M y 20 % de agua.

Columna Zorbax Eclipse XDBC8, 4,6 mm x 150 mm x 5 µ

Longitud de onda: 221 nm

Flujo: 1,0 ml/min

Volumen de inyección: 100 µl

Temperatura del horno: 35 °C

Validación del método

Los parámetros para la validación de la metodología desarrollada siguieron los lineamientos definidos por la Resolución Senasa 138/2002 y sus disposiciones modificatorias.

Resultados y discusión

Especificidad y selectividad

Para la implementación de la técnica de cromatografía líquida de par iónico en la determinación de nitritos y nitratos, se propuso la utilización de una fase móvil formada por una mezcla de metanol y agua con el agregado de bromuro de cetiltetrabutilamonio como agente de par iónico. Este reactivo presenta una parte no polar que interacciona con la fase estacionaria y un extremo iónico de carga opuesta a los analitos de interés. Esta interacción iónica permitió retenciones diferenciales que favorecieron la resolución de los picos de nitrito y nitrato.

En la Figura 2, se observa el cromatograma obtenido para una mezcla de estándares de nitrito y nitrato analizada bajo las condiciones cromatográficas descriptas anteriormente.

Durante el análisis de muestras de productos cárnicos, se observó un pico cromatográfico de señal negativa que se presentó como una interferencia del pico asignado al nitrito (Figura 3.a).

Luego de diversas pruebas pudo determinarse que el pico observado correspondía a la presencia en las muestras de cloruro de sodio, componente que se encuentra en elevada concentración en los productos cárnicos.

El agregado de nitrato de plata durante la extracción permitió la separación del cloruro de sodio por precipitación de cloruro de plata, con la consecuente desaparición de la interferencia en la corrida cromatográfica para la determinación de nitrito (Figura 3.b).

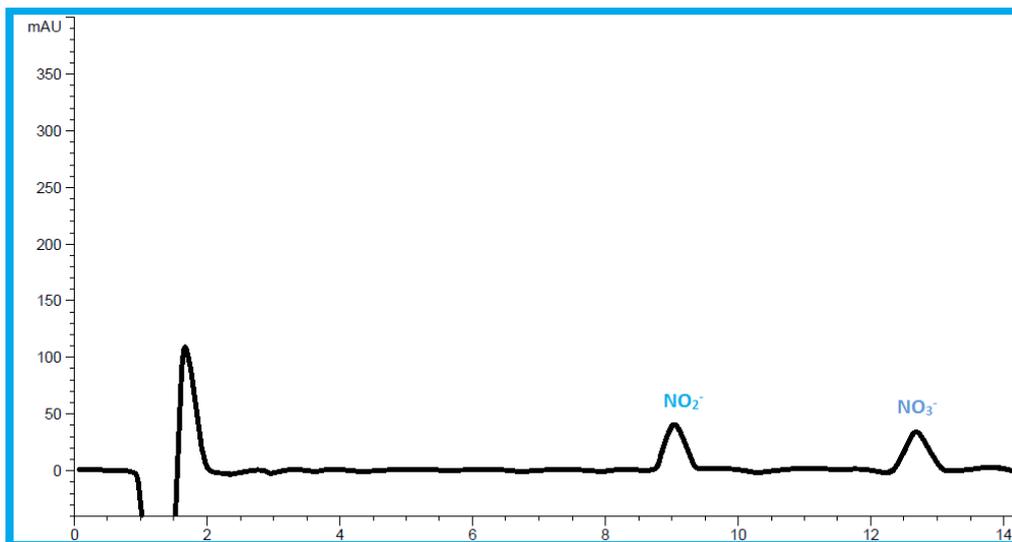


Figura 2: Cromatograma de mezcla de patrones de nitrito y nitrato.

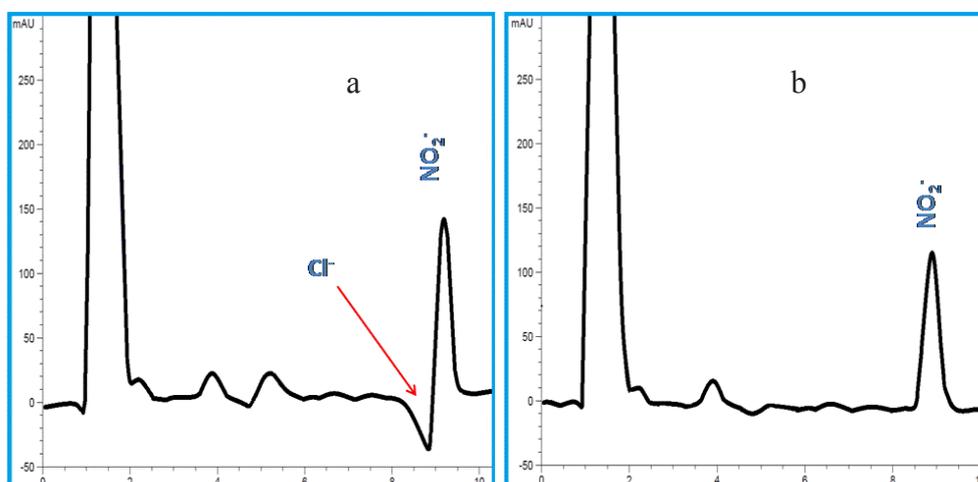


Figura 3: Cromatogramas correspondientes a muestras de jamón:
a) sin agregado de nitrato de plata 0.2N y, b) con agregado de nitrato de plata 0.2N.

Bilal Butt et ál. (2001) informaron una interferencia de ion cloruro sobre nitrato y no sobre nitrito en el análisis de distintos aniones para muestras vegetales. La utilización de la técnica de par iónico con columna de fase normal podría ser la causa de la interferencia del ion cloruro sobre el nitrato, en contraposición con lo observado en este trabajo.

Linealidad

Para el estudio de la linealidad de patrones, se trabajó con soluciones patrón de nitrito y nitrato con cinco niveles de concentración por triplicado, comprendidos en el rango 6,1-36,8 µg de ion nitrato/ml y 3,3-20 µg de ion nitrito/ml, respectivamente.

Con el objeto de confirmar que ambos analitos no interferían entre sí durante el análisis fueron corridas las curvas de calibración de cada analito en particular y de la mezcla de ambos. En la Tabla 1, se observan los resultados obtenidos para los parámetros de ajuste de las curvas de calibración analizadas. No se observan grandes diferencias entre el análisis de nitrito y nitrato en una misma tanda que en tandas separadas, razón por la cual se decidió realizar la primera de las alternativas con el fin de reducir considerablemente los tiempos de análisis.

Tabla 1: Parámetros obtenidos para las curvas de calibración de nitritos y nitratos

Analito	Pendiente	Ordenada	Coeficiente correlación (r ²)	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
				nivel 1 (n=3)	nivel 2 (n=3)	nivel 3 (n=3)	nivel 4 (n=3)	nivel 5 (n=3)
Nitrito ¹	227.9	36.5	0.999	2.3	2.4	1.0	0.8	0.5
Nitrito ²	227.4	46.0	1.000	1.9	1.8	1.0	0.9	0.3
Nitrato ¹	109.2	39.1	0.995	3.0	2.7	3.4	0.6	1.6
Nitrato ²	107.9	126.3	0.998	3.5	2.5	0.7	2.0	0.7

1Tanda de análisis de analitos por separado. 2Tanda de análisis de mezcla de analitos
CV%: desvío estándar x 100/ valor medio de los resultados obtenidos.

Los parámetros de linealidad obtenidos fueron en todos los casos comparables con los reportados en la bibliografía. En particular, Hsu et ál. (2009) reportaron coeficientes de correlación mayores o iguales a 0,998 para curvas de patrones en los rangos 5-100 µg/ml y 2,5-50 µg/ml para iones nitrito y nitrato, respectivamente, en la utilización de cromatografía de par iónico con columna de fase reversa para la determinación de ambos analitos en muestras de productos cárnicos y vegetales para evaluar la ingesta de estos por parte de la población australiana.

Reproducibilidad interna

La reproducibilidad interna o precisión intermedia se evaluó para nitritos y nitratos mediante el análisis de una muestra de jamón cocido fortificada a cinco niveles de concentración en el rango de trabajo definido previamente.

Un total de seis tandas de muestras fueron procesadas en tres días diferentes por dos analistas distintos. En cada día de análisis, fueron preparadas soluciones patrón y fase móvil, y se utilizaron el mismo equipo y la misma columna en todos los casos.

En la Tabla 2, se observan los parámetros estadísticos de evaluación de la reproducibilidad interna determinados para nitritos y nitratos.

En el análisis de diversos analitos en carne por cromatografía iónica, López Moreno et ál. (2016) obtuvieron valores de reproducibilidad menores a 10 % en los rangos de fortificación 103-410 mg/kg para el ion nitrato y 32-129 mg/kg para el ion nitrito.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo cumplen con las exigencias de la legislación utilizada como referencia para la validación (Resolución Senasa 138/2002 y modificatorias). Asimismo, estos son comparables con los resultados obtenidos por técnicas como la cromatografía iónica, pensada *a priori* como una metodología de amplia aplicación a los fines de interés.

Tabla 2: Evaluación de la precisión intermedia en el análisis de nitritos y nitratos en jamón cocido

Ion Nitrito		Ion Nitrato	
Nivel de fortificación (mg/kg)	CV% (n=6)	Nivel de fortificación (µg/g)	CV% (n=6)
33	12.9	61	11.2
67	10.6	123	10.9
100	5.1	184	6.2
133	4.3	246	8.5
200	2.4	368	3.2

Recuperación

A partir de la construcción de la curva de concentración hallada en función de la concentración de fortificación obtenida para los distintos niveles de fortificación (Figura 4a y b), se estableció el rango de recuperación del método. Este fue de 70,7-101,5 % para nitritos y de 72,9-103,8 % para nitratos.

Del ajuste lineal de las curvas correspondientes, se obtuvieron coeficientes de correlación (r^2) iguales a 0,993 para nitritos y 0,986 para nitratos.

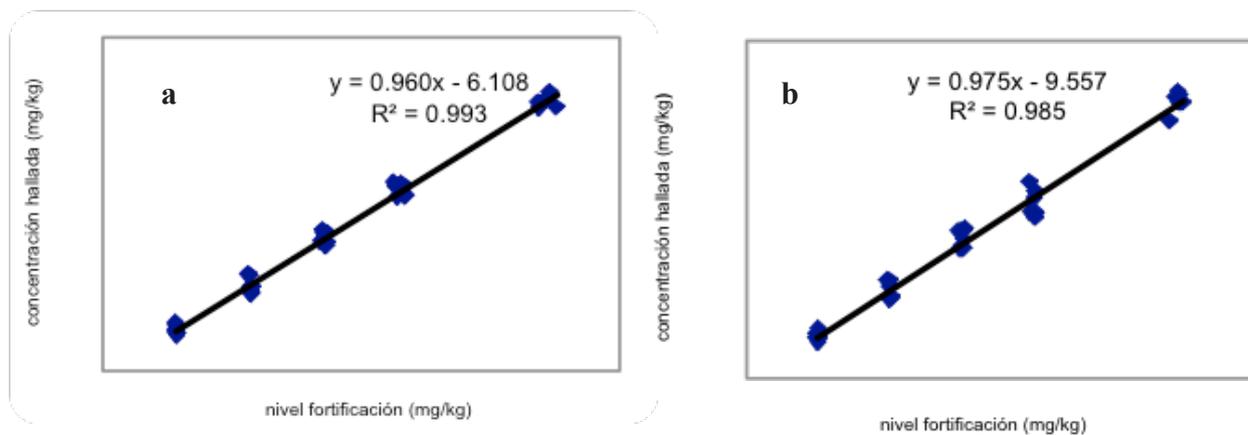


Figura 4: Curvas de recuperación para nitrito (a) y nitrato (b).

Mínimo nivel detectable y mínimo nivel cuantificable

Definiendo el mínimo nivel detectable (MND) como la concentración nominal correspondiente a la ordenada al origen de la hipérbola superior del intervalo de confianza obtenido a partir del ajuste lineal de la curva obtenida, los valores fueron en cada caso 6 mg NaNO₂/kg muestra para nitrito y 14,5 mg NaNO₃/kg muestra para nitratos.

Para el caso del mínimo nivel cuantificable (MNC), definido como tres veces el MND, los valores obtenidos fueron 18 mg NaNO₂/kg muestra para nitrito y 43,5 mg NaNO₃/kg muestra para nitratos.

Los parámetros obtenidos mediante el análisis estadístico fueron confirmados experimentalmente por triplicado en cada uno de los casos.

Estimación de la incertidumbre del método

A partir de la determinación del desvío estándar (DS) y el valor medio (VM) de los treinta datos de recuperación obtenidos a partir de los distintos niveles de fortificación, se estimó la incertidumbre de medición porcentual definida en la ecuación 1, donde RSD corresponde a desvío estándar relativo / valor medio (n=30) y k a factor de cobertura (igual a 2 para 95 % probabilidad):

$$U (\%) = \pm RSD \times k \times 100 (1).$$

De esta manera, las incertidumbres del método obtenidas para nitritos y nitratos fueron de 16,8 % y 17,6 %, respectivamente. López Moreno et ál. (2016) informaron valores de incertidumbre del mismo orden (12,7 y 16.2 para iones nitrato y nitrito, respectivamente) en el análisis de ambos analitos por cromatografía iónica.

Robustez

Con el objeto de evaluar la robustez del método se utilizó el método de Youden y Steiner (1975). Tanto para nitritos como para nitratos las variables evaluadas se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3: Condiciones para el ensayo de robustez de ambos analitos

Ion Nitrito				Ion Nitrato			
A	Jamón	a	Hamburguesa	A	Jamón	a	Hamburguesa
B	Sonicar Temperatura ambiente	b	Sonicar 40 °C	B	Sonicar Temperatura ambiente	b	Sonicar 40 °C
C	Agregado de 10 ml nitrato de plata 0.2N	c	Agregado de 20 ml nitrato de plata 0.2N	C	Sin agregado Carrez	c	Con agregado Carrez
D	Sin agregado Carrez	d	Con agregado Carrez	D	Centrífuga a 6000 rpm	d	Centrífuga a 3500 rpm
E	Centrífuga a 6000 rpm	e	Centrífuga a 3500 rpm	E	221 nm	e	210 nm
F	221 nm	f	210 nm	F	---	f	---

Al evaluarse cada una de las variables, los resultados obtenidos mostraron un efecto de las variables C-c, D-d y E-e para la determinación de nitritos con menores recuperaciones para el caso de variar el método previamente propuesto, motivo por el cual estas variables se definieron como críticas sin necesidad de modificar los parámetros previamente definidos.

Para el caso de nitratos, se encontró un efecto de la matriz en la recuperación, pero, considerando que para el caso de la hamburguesa se obtuvieron mejores valores de recuperación, se permite concluir que el método también es efectivo para la matriz de chacinado crudo evaluada.

Conclusiones

El desarrollo y la validación de una metodología para el análisis de nitritos y nitratos en productos cárnicos por cromatografía de par iónico mediante un proceso de extracción sencillo seguido de un análisis cromatográfico permitió la detección de ambos analitos en un rango de concentraciones óptimo para el control de los parámetros que establece la legislación en matrices complejas como son los productos cárnicos. Es importante destacar que debido a la alta reactividad del nitrito con distintos componentes de la matriz y al hecho que el nitrato es agregado como reserva de nitrito, la concentración obtenida durante el análisis no refleja la cantidad de ambos agregada durante la elaboración del alimento, sino el contenido residual que, en definitiva, será lo que ingiera el consumidor.

Bibliografía

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (2014), “Capítulo VI: Alimentos Cárneos y Afines”, *Código Alimentario Argentino*, Buenos Aires, ANMAT [en línea]. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp>.
- Antón, A. y J. Lizaso (2001), *Nitritos, nitratos y nitrosaminas*, Madrid, Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria [en línea]. Disponible en: <http://www.proyectopandora.es/wpcontent/uploads/Bibliografia/13181019_nitritos_nitratos.pdf>.
- Association of Official Analytical Chemists (2010), “980.23 method”, *Official Methods of Analysis*, Washington, Association of Official Analytical Chemistry.
- Bilal Butt, S.; Riaz, M. y M. Zafar Iqbal (2001), “Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography”, *Talanta* 55, pp. 789-797.
- Cammack, R.; Joannou, C.; Cui, C.; Torres Martínez, X.; Mara, J. S. y M. Hughes (1999), “Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation”, *Biochimica et Biophysica Acta* 1411, pp. 475-488.
- Ferreira, I. y S. Silva (2008), “Quantification of residual nitrite and nitrate in ham by reverse-phase high performance liquid chromatography/ diode array detector”, *Talanta* 74, pp. 1598-1602.
- García Roche, M.; García Melián, M. y R. Cañas-Pérez (1994), “Nitratos, nitritos y compuestos de N-nitroso”, *Serie Vigilancia* 13, Metepec, México, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud.
- Honikel, K. (2008), “The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products”, *Meat Science* 78, pp. 68-76.
- Labrador, R.; Masot, R.; Alcañiz, M.; Baigts, D.; Soto, J.; Martínez-Mañez, R.; García-Breijo, E.; Gil, L. y J. Barat (2010), “Prediction of NaCl, nitrate and nitrite contents in minced meat by using a voltammetric electronic tongue and an impedimetric sensor”, *Food Chemistry* 122, pp. 864-870.
- López-Moreno, C.; Viera Pérez, I. y A. Urbano (2016), “Development and validation of an ionic chromatography method for the determination of nitrate, nitrite and chloride in meat”, *Food Chemistry* 194, pp. 687-694.
- Merusi, C.; Corradini, C.; Cavazza, A.; Borromei, Ch. y P. Salvadeo (2010), “Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal”, *Food Chemistry* 120, pp. 615-620.
- Moorcroft, M.; Davis, J. y R. Compton (2001), “Detection and determination of nitrate and nitrite: a review”, *Talanta* 54, pp. 785-803.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2002), Resolución 138/2002 y modificatorias, Buenos Aires, Senasa [en línea]. Disponible en: <infolegInternet/anexos/70000-74999/72856/texact.htm>.
- Tsikas, D.; Böger, R.; Bode-Börger, S.; Gutzki, F. y J. Frölich (1994), “Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their ¹⁵N-labelled analogs”, *Journal of Chromatography B* 661 (2), pp. 185-191.
- Unión Europea (2011), Reglamento (UE) N.º 1129/2011, *Diario de la Unión Europea* L295, pp. 1-177.
- Yeh, T.; Liao, S.; Kuo, Ch. y W. Hwang (2013), “Investigation of the nitrate and nitrite contents in milk and milk powder in Taiwan”, *Journal of Food and Drug Analysis* 21 (1), pp. 73-79.
- Youden, W. y E. Steiner (1975), *Statistical manual of AOAC*, Washington, Association of Official Analytical Chemistry, pp. 50-55.