

LC/MS/MS를 이용한 식품 중 아조디카르본아미드 분해산물인 Biurea 함량 분석

임호수 · 반경녀¹ · 김준현² · 장귀현³ · 문귀임² · 양효진 · 박성관 · 박혜경⁴ · 김소희*
식품의약품안전평가원 첨가물포장과, ¹경인지방식품의약품안전청 수입식품분석과, ²식품의약품안전청 첨가물기준과,
³식품의약품안전청 건강기능식품기준과, ⁴식품의약품안전청 영양정책과

Analysis of Biurea Decomposed from Azodicarbonamide in Food Products by High Performance Liquid Chromatography Mass/Mass Spectrometry

Ho-Soo Lim, Kyeong-Nyeo Pahn¹, Jun-Hyun Kim², Gui-Hyeon Jang³, Gui-Im Moon², Hyo-Jin Yang, Sung-Kwan Park, Hae-Kyong Park⁴, and So-Hee Kim*

Food Additives and Packages Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation

¹Imported Food Analysis Division, Center for Food and Drug Analysis, Gyeongin Regional Korea Food and Drug Administration

²Food Additives Standardization Division, Korea Food and Drug Administration

³Health/Functional Food Standardization Division, Korea Food and Drug Administration

⁴Nutrition Policy Division, Korea Food and Drug Administration

Abstract This study was conducted to establish a method to analyze biurea decomposed from azodicarbonamide in processed foods such as wheat flour and bread. New method was developed using high performance liquid chromatography mass/mass spectrometry to determine biurea in wheat flour and bakery products. The recovery rate was 94.3-112.5%. The limit of detection for biurea was 0.003 mg/kg, and the limit of quantification was 0.01 mg/kg. The monitoring results for biurea content using established methods showed that biurea was detected at 2.76 mg/kg in the azodicarbonamide-detected flour (detection rate, 2%). The detection rate in processed foods such as baked goods was 27% (16/59). The detection range was 0.19-18.01 mg/kg (average, 3.79 mg/kg). However, it was thought that the detection level was safe due to much lower values than the standard (45 mg/kg). As a result, the newly established biurea analytical method will contribute to the management of azodicarbonamide in processed foods such as wheat flour and bakery products.

Key words: azodicarbonamide, LC-MS/MS, biurea, monitoring

서 론

식품첨가물은 식품의 풍미나 외관을 좋게 하고, 식품의 보존성 및 품질 향상, 영양소 보충강화 목적으로 사용되고 있다. 이들 중 azodicarbonamide(ADC)는 밀가루에 밀가루개량제 및 반죽조절제 용도로 사용되는 식품첨가물이며, 식생활이 간편화되면서 밀가루를 사용한 가공식품들에 대한 소비자의 수요가 늘어가고 있다.

ADC는 현재 우리나라를 포함하여 미국 등에서는 허용되고 있으나 일본, 유럽연합 등에서는 식품첨가물로 허용되어 있지 않다. 우리나라의 ADC 사용기준은 밀가루에 대하여 1 kg 당 45 mg (45 ppm) 이하로 규정(1) 되고 있으며, 미국에서는 잡곡 밀가루 숙성과 표백 및 제빵의 반죽 첨가제로 45 ppm 이하로 사용되도록 관리되고 있다(2).

우리나라에서 식품첨가물은 기준 및 규격을 고시하여 지정하고 있으며, 현재 607 품목이 지정되어 있으나 이들 품목 중 보존료, 산화방지제, 착색료 등의 53 품목에 대해서만 식품 중 식품첨가물 분석법이 식품공전(3,4)에 수재되어 있다. 따라서, 이들 품목 이외의 확립된 분석법이 없는 식품첨가물에 대해서는 식품에 사용여부 및 사용기준 준수 여부 등을 확인할 수 없어 사후 관리에 어려움이 있다.

ADC도 식품 중 분석방법이 없는 상태이므로 ADC 자체 및 이의 분해산물을 정확히 정성, 정량할 수 있는 분석법 확립이 요구되고 있다. 식품첨가물공전에 수재되어 있는 ADC 시험법은 치오황산나트륨 적정법으로 식품 중 미량함유되어 있는 ADC의 함량을 측정하는데 적용하기에는 불가능하므로 신속, 정확한 기기분석법의 개발이 필요하다.

ADC는 제빵과정 중 biurea, semicarbazide(SEM), ethyl carbamate(EC)로 분해되어 식품 중에 잔류하게 된다(5-11). 제빵과정 중 ADC는 wet flour와의 반응에 의해 양적으로 거의 biurea(hydrazodicarbonamide)로 전환된다. Biurea는 산분해되면 SEM이 약 0.1% 생성된다고 추정되고 있으며, ADC를 45 mg/kg 첨가할 경우 EC가 평균 2.4 µg/kg이 생성된다(12). SEM은 ADC의 분해 이외의 여러 생성원인이 있어 시험분석하는데 많은 어려움이 있다. 식품 중 검출될 수 있는 SEM의 생성경로는 크게 3가지로 분류

*Corresponding author: So-Hee Kim, Food Additives & Packages Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea
Tel: 82-2-380-1696~8
Fax: 82-2-358-0525
E-mail: mrsksh@korea.kr
Received August 31, 2009; revised March 25, 2010;
accepted April 1, 2010

할 수 있다. 첫째 니트로푸란계 동물용의약품이 니트로푸라존의 생체내 대사로 생성되며(13), 둘째는 플라스틱의 발포제 및 밀가루개량제로 사용되는 ADC의 분해로 생성되고(14,15), 셋째는 식품의 차아염소산 처리시(16) 또는 자연식품의 가열공정(17)에서 생성이 되는 것으로 알려져 있다. 그러므로 식품에서 SEM 검출 시에는 기원물질을 확인하기 어려우며 식품의 종류, 성상, 식품 유형 및 형태 등으로 유래물질을 추측할 수밖에 없다.

국외에서 밀가루 중 ADC 자체를 분석하는 방법으로는 hidrazine으로 분해 후 발색하여 자외선흡수분광기로 분석하는 방법과 액체크로마토그래피로 분석하는 방법이 보고되어 있다(18-24). 밀가루 또는 가공식품에서 ADC 분해산물의 분석은 SEM, biurea 및 EC가 보고되어 있으며, 본 연구과제에서 목표로 하고 있는 바이우레아의 분석법은 1건 보고되었으나, 방사성동위원소표지-biurea를 합성하여 내부표준물질로 사용하고 있으므로 실제분석에 바로 적용하는 것은 불가능하다. 국내에서 ADC에 대한 연구결과는 ADC를 첨가한 밀가루 반죽의 물성 및 냉동저장 중 제빵 특성의 변화 등(25)에 대한 연구뿐 밀가루 중 ADC 및 분해산물의 분석에 관한 연구결과는 없는 상태이다.

따라서, 본 연구에서는 식품 중 ADC의 사용량을 측정하기 위하여 ADC의 분해특성을 고려하여 분해중간산물인 biurea를 밀가루 및 빵류에서 분석 가능한 방법을 확립하고자 하였다. 또한, 확립된 biurea 분석법을 이용하여 국내 유통 밀가루 및 빵류 등의 식품에 대해 함유량을 분석하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

표준품으로는 biurea(TCI, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, HPLC/MS/MS 이동상으로 methanol(Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), 시료 전처리용 시약으로는 dimethylformamide(Burdick and Jackson, Muskego, MI, USA), acetonitrile(Merck)를 사용하였으며, 초순수는 Quantum Express (Millipore, Billerica, MA, USA)에 의해 저항값이 18 M Ω 이상인 정제된 물을 사용하였다. 본 연구에 사용한 밀가루 51건 및 빵 59건은 서울지역의 마트, 제과점 등에서 구입하였다.

Biurea 정제 및 추출

시료 약 2g을 정밀하게 달아 물 10 mL를 가하고 80°C 수욕에서 15분간 가열 추출하고 추가로 15분간 진탕 추출하였다. 이 추출용액을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 취한 후 acetonitrile 10 mL를 가하고 20 mL로 정용한 한 액을 액체크로마토그래피에 주입하기 전에 0.45 μ m의 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였다.

Biurea 분석을 위한 LC/MS/MS 분석 조건

ADC의 분해산물인 biurea 분석을 위해 사용된 HPLC 장비는 Agilent 1200 series(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)이었으며, MS/MS는 Agilent 6460 series LC/MSD를 사용하였다. 밀가루 및 빵 중 biurea 분석에 대한 크로마토그래피 분리를 위한 LC 분석조건은 다음과 같다. Column은 ZORBAX RX-Sil HILIC(Agilent Technologies, 4.6 \times 150 mm, 5 μ m)을 사용하였으며, column temperature는 40°C이었다. 샘플의 injection volume은 5 μ L이었다. 각 표준물질의 분리를 위해 유속은 0.8 mL/min으로 설정하였으며 이동상 A는 100 mM ammonium formate를 사용하였고 이동상 B는 methanol이었으며 기온기 용매 조건을 사용하

였다. 기온기 용매 조건은 0-5분 동안 B가 20%, 5.1-6분 동안에는 5%, 8-8.5분 동안에는 100%, 9분에는 80%로 흘러주었으며 컬럼의 재평형을 위해 20분간 흘러주었다.

사용된 질량 분석기는 Agilent 6460 series LC/MS/MS 6460이었으며, 이온화는 양이온(positive ion) 방법의 전자 분무 이온화이었다. 질량분석기는 quadrupole mass analyzer와 연결된 분석기를 사용하였다. Capillary voltage와 nebulizer pressure은 4 kV와 60 psi이었고, drying gas flow와 dry gas temperature는 11 L/min와 350°C이다.

검체중의 biurea의 농도는 시료를 일정량 취하고 전처리하여 시험용액을 제조 후, 고속액체크로마토그래피-질량분석기에 주입·분석하여 표준용액의 성분과 머무름 시간이 일치하는 피크의 면적값을 해당표준물질의 검량선에 대입하여 농도를 구한 다음, 아래의 식에 대입하여 산출하였다.

표준용액의 조제

Biurea 표준품 10 mg을 100 mL 용량플라스크에 정밀히 취하여 증류수 50 mL를 첨가하여 20분간 초음파 처리한 후 방냉하여 증류수로 정용한 것을 표준원액이라 한다(100 ppm). 표준원액을 증류수로 희석하여 0.01, 0.05, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 μ g/L로 제조하여 검량선 작성용 표준용액으로 한다.

$$\text{검체 중 biurea의 함량(mg/kg)} = \frac{\text{시험액중 농도(mg/L)} \times \text{최종 액량(mL)}}{\text{시료(g)}}$$

분석법 유효성 검증

최종적으로 확립한 분석법을 ICH Guide line Q2B에서 제시하는 방법(26)을 근거로 하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 회수율, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) 등으로 유효성 검증을 실시하였다. 회수율은 밀가루에 biurea를 최종농도 10, 25 mg/L가 되도록 첨가하고 검토한 전처리 방법을 이용하여 시료의 회수율을 시험하였다.

결과 및 고찰

추출 조건 검토

ADC의 분해 산물인 biurea 분석을 위한 추출조건은 Fig. 1과 같다. 시료에 물을 가하고 수욕에서 가열 추출한 후 이 용액을 원심분리 하여 얻은 상등액을 취하고 acetonitrile를 가한 액을 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 시료전처리에는 증류수, dimethylformamide, dimethylformamide-물 혼합용매 등을 검토하였으며, 추출효율에서는 차이를 보이지 않아 안전성 등을 고려하여 최종적으로 증류수를 사용하였다. 검체를 튜브에 정밀히 취하고 추출한 후, 원심분리하고 상등액을 취하여 추가 희석후 시험용액으로 하였다.

분석 조건 검토

ADC는 밀가루와 반응할 때 마치 수소 수용체처럼 행동하고 제빵용 조건에서 안정한 biurea로 빠르고 완전히 변환된다. ADC와 밀가루 사이의 반응은 젖어서 축축한 상태에서만 일어난다. ADC의 분해 산물인 biurea 분석을 위하여 극성이 큰 화합물로 일반 역상계 컬럼을 사용하여 분리시에는 용리시간이 너무 빨라 이동상에 이온페어링(Ion pairing) 시약 등을 첨가하여야 하며, 이 경우 이온페어링 시약의 휘발성 문제로 LC/MS/MS에 적용시 많은 제약이 따르게 된다. 따라서, Mulder 등(10)의 연구결과를 참

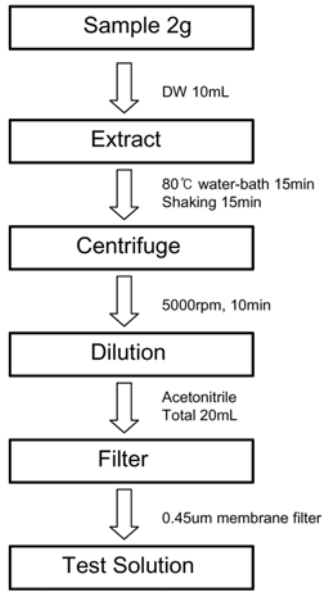


Fig. 1. Flow diagram of the sample preparation for analysis of biurea in flour and bakery products.

고로 컬럼은 이러한 문제를 해결할 수 있는 HILIC(Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) 방식의 분리 컬럼을 사용하였다. Agilent사의 ZORBAX RX-Sil HILIC(4.6×150 mm, 5 μm) 컬럼이 분리능, 피크의 대칭성 등의 분리성능 면에서 우수하여, 본 연구에 사용하였다.

MS/MS 분석을 위해 biurea의 극성이 매우 크므로 이온화 방법으로는 ESI(Electrospray Ionization)를 선택하였고, positive 및 negative mode를 비교한 결과 positive mode의 감도가 월등하여 이를 사용하였으며, 이는 두 화합물 모두 아미노기를 주요 기능기로 하고 있기 때문으로 판단된다. 기타 MS의 drying gas, sheath gas, capillary voltage, nozzle voltage, EM voltage 등과 같은 parameter를 최적화하여, 최적의 감도와 분리능을 갖도록 조건을 설정하였다.

분석의 선택성과 감도를 향상시키기 위하여 MS/MS 분석시 MRM(multiple reaction monitoring) mode로 분석하였으며, dwell time, fragmentor voltage, collision energy 등을 조정하여 최적의 감도를 나타내도록 조정하였다.

Biurea 이온($m/z=119$)은 위의 MS 조건에서 분해되어 $m/z=76$, 59 및 31의 product ion을 생성하며, SEM 이온($m/z=76$)은 분해되어 $m/z=59$ 및 31의 product ion을 생성하였다(Fig. 2).

분석법 검증

특이성(specificity)은 존재할 것으로 예상되는 다른 물질의 영향을 받지 않고 목적 성분을 분석할 수 있는지를 검증하는 항목으로 표준용액과 시험용액 중 biurea를 분석한 결과 표준용액 중 biurea의 retention time은 4.3분이었으며, biurea로부터 분해되어 생성되는 SEM의 경우 retention time은 3.7분이었다. biurea의 분해로 생성되는 SEM 이온의 간섭을 배제할 수 있음을 확인하였다(Fig. 3). 또한 LC/MS/MS 특성상 다른 방해성분의 간섭을 받지 않고 특이성을 보이는 것으로 나타났다. ADC에 대한 문헌결과를 종합할 때, 대부분이 biurea로 환원분해되고 소량만이 SEM로 분해되는 것으로 사료된다. 따라서 확립된 biurea의 분석법을 밀가루함유 가공식품에서 니트로푸란계항생제의 분석시 문제가 되는 SEM의 위양성여부를 판단하는 분석법으로 활용가능할 수도 있다고 판단된다.

직선성(linearity)은 분석의 정확도 및 범위가 관련이 있는 것으로 기기분석 시 측정농도와 반응값의 상관성을 측정하는 것으로 직선성을 확인하기 위하여 biurea 표준용액을 각각 0.05, 0.1, 1, 5, 10 mg/L 농도로 조제하여 상관관계값을 작성하였다. 5개 농도 범위로 표준용액을 3회 제조하여 각각의 검량선을 작성한 결과 biurea는 0.05-10 mg/L의 범위 내에서 농도와 반응값의 상관계수가 0.996으로 양호한 직선성을 나타내었다(data not shown). 범위는 특정 실험방법의 측정범위를 말하는 것으로 정밀성과 정확성을 나타내며, 직선성이 유지되는 범위를 말한다. 본 연구에서 설정한 실험방법의 측정범위는 직선성과 정밀성을 모두 감안하여 0.05-10 mg/L를 범위로 설정하였다.

반복실험간에 정밀성을 확인하기 위하여 biurea의 표준용액을

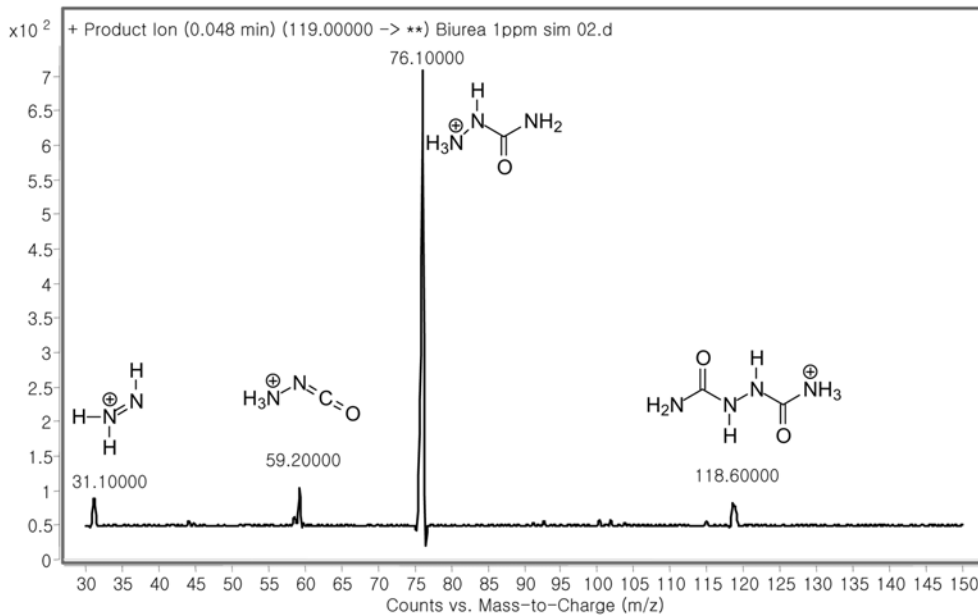


Fig. 2. MS/MS patterns of biurea (119→***).

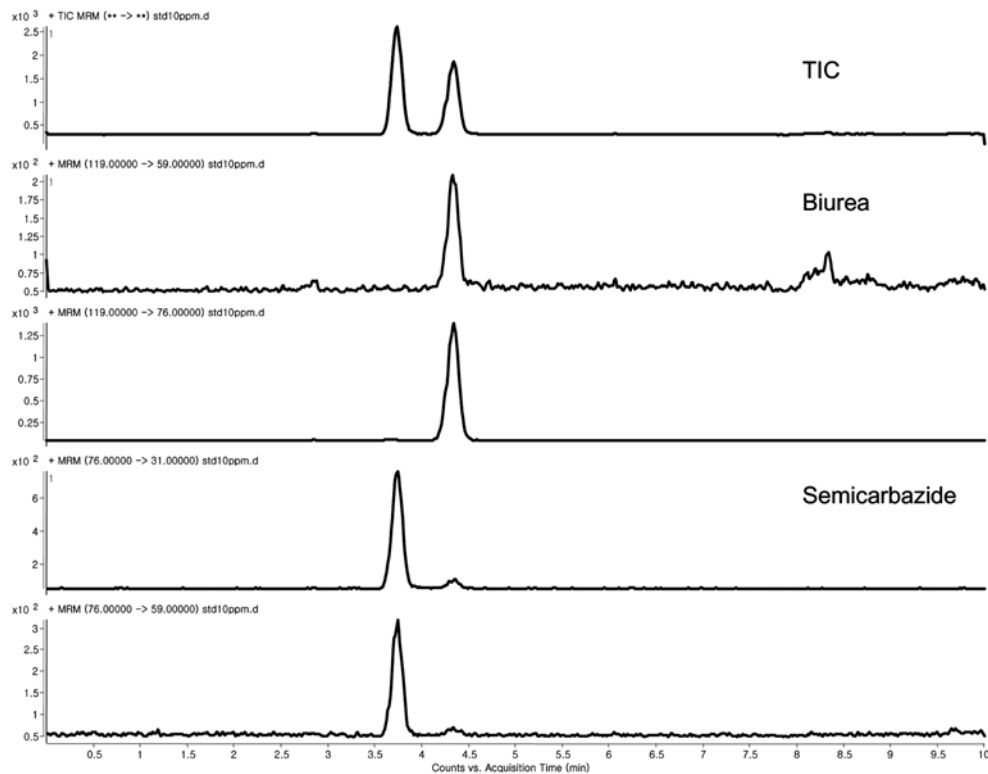


Fig. 3. Specificity of biurea (10 mg/L) at LC/MS/MS chromatogram.

9회 제조하여 각각의 농도를 측정하였다. 10 mg/L의 농도가 되도록 biurea를 반복 제조하여 분석한 결과 peak의 면적 및 retention time 모두 상대표준편차(%RSD)가 각각 0.05%, 1.68%로 모두 2% 미만으로 반복실험간 오차가 낮은 것으로 나타났다(data not shown).

ADC의 분해산물인 biurea 분석을 위하여 설정된 전처리 조건의 확인을 위하여 밀가루에 대하여 회수율을 측정된 결과는 Table 1과 같다. ADC는 현행 식품첨가물공전의 사용기준에 밀가루에 사용하도록 규정되어 있어 밀가루를 대상으로 회수율을 측정하였다. 밀가루에 biurea 표준물질을 첨가하여 회수율을 검토한 결과 회수율은 94.3-112.5%를 보여 양호하였다.

크로마토그래피에서 검출한계(limit of detection, LOD)란 base-line의 잡음으로부터 3배 이상인 농도로 정의하고 있으며, 검출한계를 설정하기 위한 방법은 이론적인 계산치를 통한 방법도 있지만 실제의 농도로 확인하는 것이 더욱 정확하므로 검출한계로 예상되는 농도를 분석하였다. 확립된 분석조건으로 표준품을 대상으로 S/N비(signal to noise ratio)를 3으로 하여 biurea의 검출한계를 측정된 결과(Table 2) 0.003 mg/L의 농도까지도 biurea는

Table 1. Recovery rates of biurea at various spike levels

No.	Biurea spike level (mg/L)	
	10	25
1	11.4391	24.5152
2	11.4438	24.0564
3	10.8626	22.1686
Mean	11.25	23.58
SD	2.97	5.27
Recovery rate (%)	112.5	94.3

base-line 잡음과 구별이 됨을 확인할 수 있었다. 또한, 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 측정된 결과(Fig. 4) 0.01 mg/L의 농도까지 정량이 가능하였다. Biurea 경우 precursor ion $m/z=119$ 로부터 유래한 product ion 중 $m/z=76$ 이 59보다 검출한계 및 정량한계에서 100배 정도 낮은 값을 나타내어 분석 m/z 로 선정하였다.

국내 유통 식품 중 biurea 함량 분석

Biurea는 수분함량이 비교적 적은 밀가루 상태에서도 밀글루텐과 소량 함유되어 있는 물에 의하여 ADC가 biurea로 환원되어 생성된다. 따라서 밀가루 중에 함유되어 있는 ADC의 전체량을 알기 위해서는 분해산물의 측정이 필수적이라고 판단된다. ADC의 분해산물인 biurea 분석법으로 국내 유통 중인 51개 밀가루 및 59개 빵 등에 대하여 biurea의 함량분석 결과는 Table 3에 나타났다. 밀가루 중 biurea의 함량 분석 결과 밀가루 및 밀가루가 주원료인 튀김가루 51건 중 1건에서 biurea가 검출되었으며(검출율: 2%), 빵 등 밀가루가 함유된 가공식품 59건에서는 총 16건에서 biurea가 검출되었다(검출율: 27%). 밀가루 및 밀가루가 주원료인 튀김가루에서 검출된 biurea의 농도는 2.76 mg/kg으로 밀가루에 첨가된 ADC가 분해되어 biurea가 생성된 것으로 판단되며, 사용한 ADC의 초기 함유량은 약 3 mg/kg으로 예상되었다.

Table 2. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of standard solution

Standard	MS/MS	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Biurea	11976	0.003	0.01
	11959	0.3	1.0
	11931	1.0	3.0

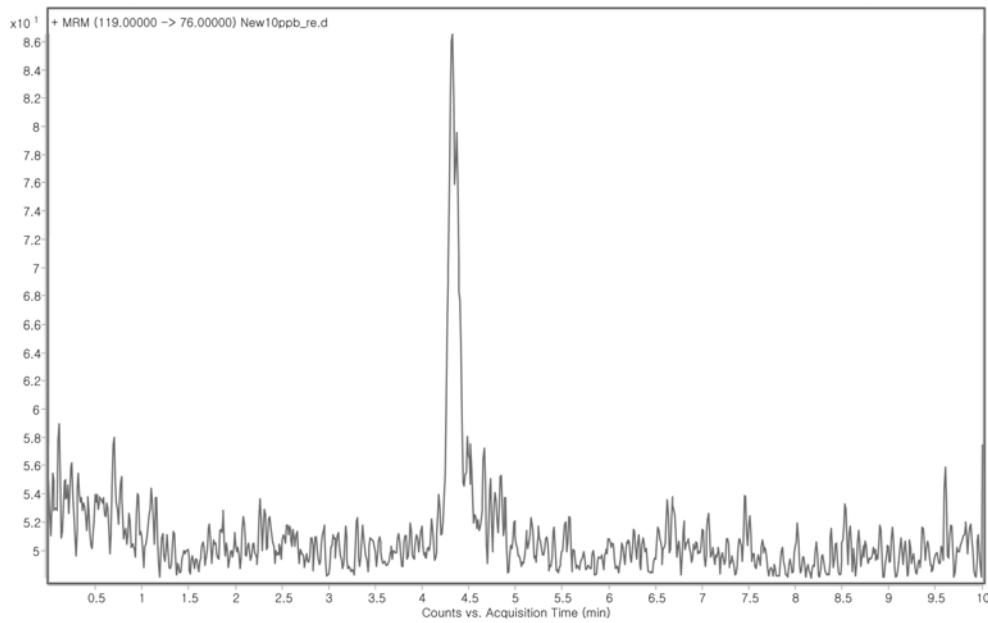


Fig. 4. LC/MS/MS chromatograms of biurea at LOQ (0.01 mg/L, 119→76).

Table 3. Biurea levels in wheat flour and bakery products retailed in market (Unit: mg/kg)

Group	Sample	Number of sample		Biurea level
		Tested	Detected	Range
1	Flours ¹⁾	51	1	ND ²⁾ -2.76
2	Bakery	59	16	ND-18.01

¹⁾Wheat flour, flying flour, and making mix are included.

²⁾ND: not detected means below limits of detection (0.003 mg/kg).

현행 식품첨가물공전의 사용 기준에서 ADC는 밀가루 1kg당 45 mg 미만으로 사용 가능하므로 검출된 biurea의 양으로 ADC의 첨가량은 사용기준에 적합한 것으로 사료된다.

빵 등 밀가루가 함유된 가공식품에서 검출된 biurea의 농도는 0.19-18.01 mg/kg(검출평균 3.79 mg/kg)으로 함유농도의 편차가 크게 나타났으며, 이는 빵 등의 제조에 사용되는 밀가루의 비율의 차이 뿐만 아니라 실제 사용되는 ADC의 농도에도 차이가 있기 때문으로 판단된다. 빵 등 가공식품에서 biurea의 검출율이 높은 이유는 ADC를 사용한 빵의 구입에 중점을 둔 것이 가장 큰 이유로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 식품의약품안전청에서 시행한 연구개발사업(08081영기안092)에 의해 수행된 결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

요약

ADC는 밀가루개량제로 사용기준이 설정되어 있는 식품첨가물이나 이의 사용량과 잔류량을 확인할 수 있는 시험분석법이 확립되어 있지 않은 상태임으로 사전·사후 안전관리를 위해서 ADC의 분해산물인 biurea를 밀가루 및 빵류에서 분석 가능한 방

법을 확립하고자 하였다.

식품 중 ADC의 분해산물인 biurea 분석을 위하여 컬럼, 이동상 조건, 전처리 조건, 기기조건 등을 검토하여 LC/MS/MS를 이용한 분석법을 확립하였으며, 개발된 분석법의 회수율, 분석법의 유효성 검증 등을 검토하였다. 회수율은 94.3-112.5%로 양호하였으며, 검출한계(LOD)는 0.003 mg/L의 농도이었고, 정량한계(LOQ)는 0.01 mg/L의 농도이었다. 확립된 분석법에 의해 밀가루 등 51건, 빵 등의 가공식품 59건에 대하여 biurea 함량을 분석한 결과 밀가루 1건에서 2.76 mg/kg의 농도로 검출되었고(검출율: 2%), 빵 등 가공식품에서는 16건이 검출(검출율: 27%)되었으며 검출농도 범위는 0.19-18.01 mg/kg(평균: 3.79 mg/kg)이었다. ADC의 사용기준인 밀가루 1kg당 45 mg에 비하여 매우 낮은 값을 나타내었다. 본 연구를 통하여 확립된 식품 중 biurea 분석법으로 밀가루, 빵류 등의 가공식품에 대한 ADC의 사후관리에 기여할 것으로 본다.

문헌

1. Korea Food and Drug Administration. Food Additives Code. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea. pp. 233-234 (2009)
2. United States Food and Drug Administration. 21CFR172.806 Azodicarbonamide. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/>. Accessed Aug. 30, 2009.
3. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. Analytical Methods of Food Additives in Foods. 3rd ed. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul, Korea. pp. 1-100 (2009)
4. Korea Food and Drug Administration. Food Standards Code. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea. (2008)
5. Food and Agriculture Organization of United Nations. Combined Compendium of Food Additive Specifications-Azodicarbonamide. Available from: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/details.html?id=46>. Accessed Aug. 30, 2009.
6. Weak ED, Hoseney RC, Seib PA. Determination of azodicarbonamide in wheat flour. Cereal Chem. 53: 881-889 (1976)
7. Becalski A, Lau BPY, Lewis D, Seaman SW. Semicarbazide formation in azodicarbonamide treated flour-A model study. J. Agr. Food Chem. 52: 5730-5734 (2004)

8. Noonan GO, Warner CR, Hsu W, Begley TH, Perfetti GA, Diachenko GW. The determination of semicarbazide (N-amino-urea) in commercial bread products by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* 53: 4680-4685 (2005)
9. de la Calle MB, Anklam E. Semicarbazide-occurrence in food products and state-of-the-art in analytical methods used for its determination. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 968-977 (2005)
10. Mulder PPJ, Beumer B, Rhijn JAV. The determination of biurea: A novel method to discriminate between nitrofurane and azodicarbonamide use in food products. *Anal. Chem. Acta* 586: 366-373 (2007)
11. Food and Agriculture Organization of United Nations. FAO Nutrition Meetings Report (1966). Series 40, A, B, C. Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/40abcj28.htm>. Accessed Aug. 30, 2009.
12. Dennis MJ, Massey RC, Ginn R, Parker I, Crews C, Zimmerli B, Zoller O, Rhyn P, Osborne B. The effect of azodicarbonamide concentrations on ethyl carbamate concentrations in bread and toast. *Food Addit. Contam.* 14: 95-100 (1997)
13. Horie M, Tabara Y, Ishii R, Hashimoto K, Yamagishi Y. Determination of nitrofurazone in livestock products and seafoods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 49: 204-210 (2008)
14. Phongvivat S. Nitrofurans case study: Thailand's experience. Joint FAO/WHO Technical Workshop on Residues of Veterinary Drugs without ADI/MRL. August 24-26, Bangkok, Thailand. Food and Agriculture Organization of United Nations/World Health Organization, Rome, Italy (2004)
15. de Souza SVC, Junqueira RG, Ginn R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)-In-house method validation. *J. Chromatogr. A* 1077: 151-158 (2005)
16. Hoenicke K, Gatermann R, Hartig L, Mandix M, Otte S. Formation of semicarbazide (SEM) in food by hypochlorite treatment: is SEM a specific marker for nitrofurazone abuse. *Food Addit. Contam. A* 21: 526-537 (2004)
17. Gatermann R, Hoenicke K, Mandix M. Formation of semicarbazide (SEM) from natural compounds in food by heat treatment. *Czech. J. Food. Sci.* 22: 353-354 (2004)
18. Osborne BG. High performance liquid chromatography of azodicarbonamide. *J. Chromatogr. A* 368: 401-404 (1986)
19. de Stefanis VA. Analysis of azodicarbonamide in wheat flour by liquid chromatography. *Cereal Chem.* 65: 52-55 (1988)
20. Becalski A, Lau BPY, Lewis D, Seaman S. Semicarbazide in Canadian bakery products. *Food Addit. Contam. A* 23: 107-109 (2006)
21. Pereira AS, Donato JL, De Nucci G. Implications of the use of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone contamination in coated products. *Food Addit. Contam. A* 21: 63-69 (2004)
22. Conant JB, Bartlett PD. A quantitative study of semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.* 54: 2881-2899 (1932)
23. Canas BJ, Diacheoko GW, Nyman PJ. Ethyl carbamate levels resulting from azodicarbonamide use in bread. *Food Addit. Contam. A* 14: 89-94 (1997)
24. Dennis MJ, Massey RC, Ginn R, Parker I, Crews C, Zimmerli B, Zoller O, Rhyn P, Osborne B. The effect of azodicarbonamide concentrations on ethyl carbamate concentrations in bread and toast. *Food Addit. Contam. A* 14: 95-100 (1997)
25. La IJ, Lee MC, Park HD, Kim KP. Effects of azodicarbonamide on the rheology of wheat flour dough and the quality characteristics of bread. *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.* 33: 1566-1572 (2004)
26. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Topic Q2 (R1). Validation of analytical procedures: Text and methodology. European Medicines Agency, CPMP/ICH/381/95/1995. Available from: www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf. Accessed Aug. 30, 2009.