J. Fd Hyg. Safety
Vol. 25, No. 2, pp. 100~105 (2010)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

HPLC를 이용한 식품 중 아조디카르본아미드 분석

임호수[1] · 반경녀[4] · 김준현[2] · 장귀현[5] · 문귀임[2] · 양효진[1] · 박성관[1] · 박혜경[3] · 김소희[1]*
[1]식품의약품안전평가원 첨가물포장과, [2]식품의약품안전청 첨가물기준과, [3]식품의약품안전청 영양정책과,
[4]경인지방식품의약품안전청 수입식품분석과, [5]식품의약품안전청 건강기능식품기준과

Analysis of Azodicarbonamide in Food Products by High Performance Liquid Chromatography

Ho-Soo Lim[1], Kyeong-Nyeo Bahn[4], Jun-Hyun Kim[2], Gui-Hyeon Jang[5], Gui-Im Moon[2], Sung-Kwan Park[1], Hyo-Jin Yang[1], Hae-Kyong Park[3], and So-Hee Kim[1]*
[1]*Food Additives and Packages Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea*
[2]*Food Additives Standardization Division, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea*
[3]*Nutrition Policy Division, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea*
[4]*Imported Food Analysis Division, Center for Food and Drug Analysis, Gyeongin Regional Korea Food and Drug Administraion*
[5]*Health/Functional Food Standardization Division, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea*
(Received September 21, 2009/Revised October 19, 2009/Accepted June 19, 2010)

ABSTRACT – This study was conducted to establish a method to analyze azodicarbonamide (ADA) in wheat flour. A new method using high performance liquid chromatography (HPLC) was developed for the determination of ADA in wheat flour. The recovery rate was 91.93~97.54%. The limit of detection for ADA was 0.02 mg/kg and the limit of quantification was 0.05 mg/kg. The monitoring results for ADA contents using the established methods showed that it was detected as the low value of 0.95 mg/kg in one of 51 flour samples (detection rate : 2%), but not detected in 59 bakery samples. The detected ADA level was suitable to its usage standard, compared to the standard (45 mg/kg). Although the detection rate was very low, the established analytical method of ADA will contribute to the management of ADA in processed foods such as wheat flour and bakery.

Key words : Azodicarbonamide, HPLC, Wheat flour, Monitoring

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

ADA는 현재 우리나라를 포함하여 미국 등에서는 허용되고 있으나 일본, 유럽연합 등에서는 식품첨가물로 허용되어 있지 않다. 우리나라의 ADA 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[3)].

우리나라에서 식품첨가물은 기준 및 규격을 고시하여 지정하고 있으며, 현재 607 품목이 지정되어 있으나 이들 품목 중 보존료, 산화방지제, 착색료 등의 50 품목에 대해서만 식품 중 식품첨가물분석법이 식품공전[2,4)]에 수재되어 있다. 따라서, 이들 품목 이외의 확립된 분석법이 없는 식품첨가물에 대해서는 식품에 사용여부 및 사용기준 준수 여부 등을 확인할 수 없어 사후관리에 어려움이 있다.

ADA도 식품 중 분석방법이 없는 상태이므로 ADA 자체 및 이의 분해산물을 정확히 정성, 정량할 수 있는 분석법 확립이 요구되고 있다. 식품첨가물공전에 수재되어 있는 ADA 시험법은 치오황산나트륨 적정법[1)]으로 식품 중 미량 함유되어 있는 ADA의 함유량을 측정하는데 적용하기에는 불가능하므로 신속, 정확한 기기분석법의 개발이 필요하다.

*Correspondence to: So-Hee Kim, Food Additives and Packages Division, 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

ADA는 제빵과정 중 biurea, semicarbazide (SEM), ethyl carbamate (EC)로 분해되어 식품 중에 잔류하게 된다[5-11]. 제빵과정 중 ADA는 wet flour와의 반응에 의해 양적으로 거의 biurea (hydrazodicarbonamide)로 전환된다. Biurea는 산분해되면 SEM이 약 0.1% 생성된다고 추정되고 있으며[10], ADA를 45 mg/kg 첨가할 경우 EC가 평균 2.4 ug/kg이 생성된다[12].

국외에서 밀가루 중 ADA 자체를 분석하는 방법으로는 hidrazine으로 분해 후 발색하여 자외선흡수분광기로 분석하는 방법과 액체크로마토그래피로 분석하는 방법들이 보고되어 있다[13-16,17-23].

국내에서는 ADA에 대한 연구결과는 ADA를 첨가한 밀가루 반죽의 물성 및 냉동저장 중 제빵 특성의 변화 등[24]에 대한 연구뿐 밀가루 중 ADA의 분석에 관한 연구는 없는 상태이다.

따라서, 본 연구에서는 식품 중 ADA의 사용량을 측정하기 위하여 ADA를 분해하는 hidrazine을 사용하여 전처리를 하지 않고 밀가루에서 분석 가능한 방법을 확립하고자 하였다. 또한, 확립된 분석법을 이용하여 국내 유통 밀가루 및 빵류에 대해 함유량을 분석하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

표준품으로는 ADA (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였으며, HPLC 이동상으로 methanol (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), 시료 전처리용 시약으로는 dimethylforamamide (Burdick and Jackson, Muskego, MI, USA), acetonitrile (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), acetone (Duksan, Korea)을 사용하였으며, 초순수는 Quantum Express (Millipore, Billerica, USA)에 의해 저항값이 18 MΩ 이상인 정제된 물을 사용하였다. 본 연구에 사용한 밀가루 51건 및 빵류 59건은 서울지역의 마트 등에서 구입하였다.

ADA 정제 및 추출

시료 약 2 g을 정밀히 달아 물 10 mL를 가하고 10분간 진탕하여 추출하였다. 이 추출용액을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 취한 후 물을 가하여 20 mL로 정용한 액을 액체크로마토그래프에 주입하기 전에 0.45 μm의 멤브레인필터로 여과하여 시험용액으로 하였다.

ADA 분석을 위한 HPLC 분석 조건

ADA을 분석하기 위해 사용된 HPLC 장비는 HPLC-PDA system (Beckmann Coutler, Germany)이었으며, UV 스펙트럼 측정을 위해서는 8453 자외/가시분광광도계 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 밀가루 중 ADA 분석에 대한 크로마토그래피 분리를 위한 HPLC 분석조건은 다음과 같다. Column은 Imtakt Unison US-C_{18} (4.6 × 250 mm, 5 μm)을 사용하였으며, column temperature는 40°C 이었다. 샘플의 injection volume은 10 μL이었다. 각 표준물질의 분리를 위해 유속은 0.7 mL/min으로 설정하였으며 이동상 A는 증류수를 사용하였고 이동상 B는 acetonitrile 이었으며 기울기 용매 조건을 사용하였다. 기울기 용매 조건은 0분에 B가 100%, 7분 동안 B가 50%, 12분 동안에는 50%, 12.1분 동안에는 0%, 17분에는 0%로 흘려주었으며 컬럼의 재평형을 위해 17분간 흘려주었다.

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

$$\text{시료 중 아조디카르본아미드의 농도(mg/kg)} = \frac{\text{시험액의 농도(mg/L)} \times \text{최종 액량(mL)}}{\text{시료량(g)}}$$

표준용액의 조제

ADA 표준품 50 mg을 1000 mL 용량플라스크에 정밀히 취하여 증류수 900 mL을 첨가하여 20분간 초음파 처리한 후 방냉하여 증류수로 정용한 것을 표준원액이라 한다 (50 ppm). 표준원액을 증류수로 희석하여 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 mg/L로 제조하여 검량선 작성용 표준용액으로 한다.

분석법 유효성 검증

최종적으로 확립한 분석법을 ICH Guide line Q2B에서 제시하는 방법[18]을 근거로 하여 특이성 (specificity), 직선성 (linearity), 회수율, 검출한계 (LOD) 및 정량한계 (LOQ) 등으로 유효성 검증을 실시하였다. 회수율은 밀가루에 ADA를 최종농도 10, 20, 50 mg/L가 되도록 첨가하고 검토한 전처리 방법을 이용하여 시료의 회수율을 시험하였다.

결과 및 고찰

추출 조건 검토

ADA의 분석을 위한 추출조건은 Fig. 1와 같다. 시료에 물을 가하고 수욕에서 가열 추출한 후 이 용액을 원심분리 하여 얻은 상등액을 취하고 물을 가한 액을 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 시료전처리에는 증류수, dimethyl formamide, dimethylformamide-물 혼합용매, 아세톤 등을 검토하였으며, 추출효율에서는 차이를 보이지 않아 최종적으로 증류수를 사용하였다. 검체를 튜브에 정밀히 취하고 추출한 후, 원심분리하고 상등액을 취하여 추가 희석후 시험용액으로 하였다.

분석 조건 검토

ADA 분석을 위하여 검토한 HPLC 분석조건은 Table 1

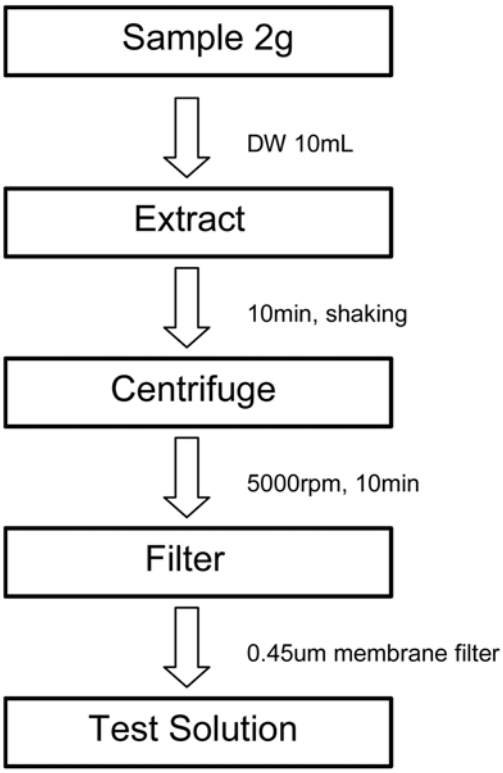

Fig. 1. Flow diagram of the sample preparation for analysis of ADA.

과 같다. ADA는 극성이 비교적 큰 물질이나 Osborne[18]의 연구결과를 참고로 역상계 컬럼인 C_{18} 컬럼을 검토한 결과, 분리능, 피크의 대칭성 등의 분리성능 면에서 우수한 결과를 나타내었고, 실제 분석시에는 Imtakt Unison US-C_{18} (5 μm, 4.6 × 250 mm) 컬럼을 사용하였다. 또한, 분리도 향상, 분석시간 단축 등을 위하여 이동상 조건을 Table 1과 같이 설정하였다.

이동상으로 완충용액 등의 사용 없이도 유지시간(RT) 등에 재현성에 문제가 없었으며, 기본 용리액으로는 물을, 용리가 늦은 불순물 등의 컬럼 오염물질을 제거하기 위하여 아세토니트릴로 기울기용리를 하였다. 위 이동상 조건에

Table 1. HPLC condition for analysis of ADA in foods

Parameters	Values
Instrument	Beckman Coulter - System Gold HPLC
Software	32 Karat™ 8.0
Solvent	0 min B 0%, 7 min B 50%, 12.0 min B 50%, 12.1 min B 0%, 17.0 B 0% A : Distilled water B : Acetonitrile
Column	Imtakt Unison US-C18, 5 μm, 4.6 × 250 mm
Run time	17 min
Flow rate	0.7 mL/min
Detector	PDA 245 nm, (Slit with = 4)
Column temp.	40°C

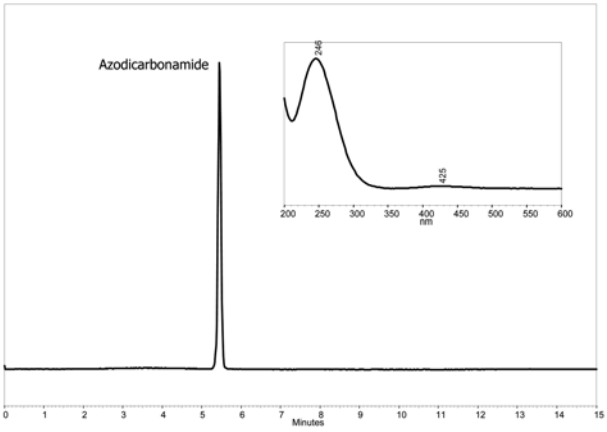

Fig. 2. HPLC chromatogram and UV/Vis spectrum of ADA standard.

서 측정한 RT=5.3인 아조디카르본아미드의 흡수스펙트럼은 Fig. 2와 같으며, 245 nm 및 425 nm 흡수봉우리를 나타내었으며, 일차적으로 245 nm 및 425 nm를 분석파장으로 하였으며, 흡광계수가 높아 감도가 좋은 245 nm를 주분석파장으로 하여 정량분석을 실시하였다. 확립된 HPLC 분석조건은 다음 Table 1과 같다.

분석법 검증

특이성 (specificity)은 존재할 것으로 예상되는 다른 물질의 영향을 받지 않고 목적 성분을 분석할 수 있는지를 검증하는 항목으로 표준용액과 시험용액 중 ADA의 RT를 비교 분석한 결과, RT 5.4 min대에 분리됨을 확인하였으며 (Fig. 2,3), ADA 표준물질의 최대흡수파장은 245 nm로서 시험용액 중 동일한 RT를 가지는 ADA와 PDA (Photo Diode Array) spectrum이 일치함을 확인하였다 (Fig. 2,3). 이상의 결과 ADA이 검출되는 시간대에서 해당 피크가 특이한 방해성분 없이 검출됨을 확인하였다.

직선성 (linearity)은 분석의 정확도 및 범위와 관련이 있는 것으로 기기분석 시 측정농도와 반응값 (면적)의 상관성

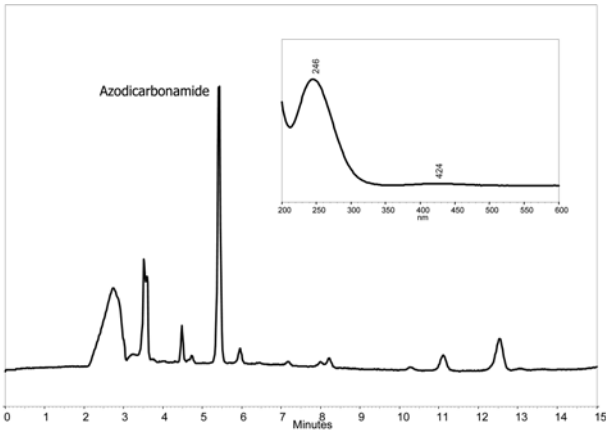

Fig. 3. HPLC chromatogram and spectrum of ADA in spiked sample.

Table 2. Reproducibility of retention time and peak area of ADA at 10 mg/L

Times	Retention time(min.)	Peak area
1	5.300	771884
2	5.300	768087
3	5.300	771099
4	5.317	786103
5	5.317	777435
6	5.300	784784
7	5.300	810891
8	5.317	795605
9	5.317	796398
10	5.317	802724
Mean	5.309	786501
SD	0.009	14583.64
%RSD	0.17	1.85

Table 3. Recovery rates of ADA by various spike level

No.	ADA spike level (mg/L)		
	10	25	100
1	18.528	24.5152	98.120
2	18.338	24.0564	96.610
3	18.529	22.1686	97.886
Mean	18.39	46.94	97.54
SD	0.13	0.49	0.81
Recovery rate(%)	91.93	93.89	97.54

을 측정하는 것으로 직선성을 확인하기 위하여 ADA 표준용액을 각각 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 mg/L 농도로 조제하여 상관관계값을 3회 측정한 결과, 검량선식은 $y = 0.0671\chi - 0.0474$이었으며 R^2의 값은 1로 직선성은 매우 양호하였다. ADA의 RT 5.4 min에서 7개 농도범위로 표준용액을 3회 제조하여 각각의 검량선을 작성한 결과 ADA는 0.05-25 mg/L의 범위 내에서 농도와 반응값의 상관계수가 1.0으로 매우 양호한 직선성을 나타내었다. 범위는 특정 실험방법의 측정범위를 말하는 것으로 정밀성과 정확성을 나타내며, 직선성이 유지되는 범위를 말한다. 본 연구에서 설정한 실험방법의 측정범위는 직선성과 정밀성을 모두 감안하여 0.05-25 mg/L을 범위로 설정하였다.

반복실험간에 정밀성을 확인하기 위하여 ADA의 표준용액을 10회 제조하여 피크 면적 및 RT를 비교 분석하였다. 10 mg/L의 농도가 되도록 ADA 시료를 반복 제조하여 분석한 결과, peak의 면적 및 RT의 상대표준편차 (%RSD)는 각각 1.85%, 0.17%로 모두 2% 미만으로 반복실험간 오차가 낮은 것으로 나타났다 (Table 2).

ADA의 분석을 위하여 설정된 전처리 조건의 확인을 위하여 밀가루에 대하여 회수율을 측정한 결과는 Table 3과 같다. ADA는 현행 식품첨가물공전의 사용기준에 밀가루

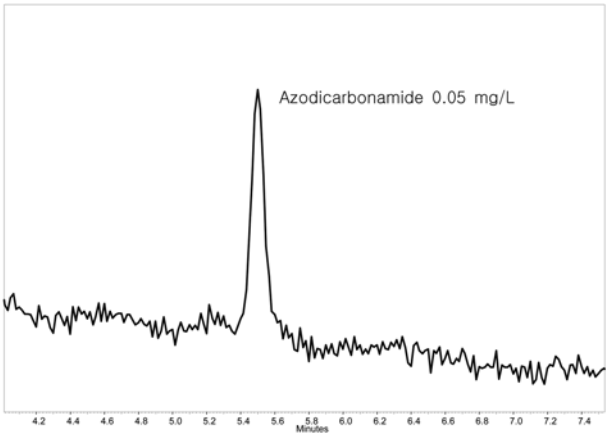

Fig. 4. HPLC chromatogram of ADA at LOQ (10 ug/L, 245 nm).

에 사용하도록 규정되어 있어 밀가루를 대상으로 회수율을 측정하였다. 밀가루에 ADA 표준물질을 최종농도가 10, 20, 50 mg/L가 되도록 첨가하여 회수율을 검토한 결과, 회수율은 90% 이상을 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 ration)를 3으로 하여 ADA의 검출한계를 측정한 결과 (Table 4) 0.02 mg/L의 농도까지도 ADA는 base-line 잡음과 구별이 됨을 확인할 수 있었다. 또한, 정량한계 (limit of quantification, LOQ)를 측정한 결과 (Fig. 4) 0.05 mg/L의 농도까지 정량이 가능하였다.

본 연구에서 확립된 식품중 ADA 분석법은 hidrazine으로 분해하여 발색한 후 자외선흡수 분광기로 분석하는 방법에 비해 보다 정밀한 기기분석법이며, 정밀성, 정확성, 회수율 등의 면에서 상대적으로 우수하였다. 또한, 기존에 보고된 HPLC 분석방법과 비교하면 기존 문헌들에서 사용한 dimethylformamide 추출용매를 사용하지 않고 물로 추출하고, silica gel을 사용하지 않아 전처리 시간이 단축되었다. Specificity 및 Sensitivity는 기존에 보고된 문헌의 결과와 유사하다고 판단되며 밀가루나 빵류에 들어있는 ADA를 분석하는데 어려움은 없는 것으로 판단된다. 회수율의 경우 역상 HPLC-ECD detector를 이용하여 C18 컬럼으로 분석한 결과 밀가루 중 ADA의 회수율이 약 87%이

Table 4. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of standard solution (Unit : mg/kg)

Standard	Wave (nm)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Azodicarbonamide	245 nm	0.003	0.01
	425 nm	0.3	1.0

Table 5. ADA levels in wheat flour and bakery retailed in market

Group	Sample	Number of sample		ADA level
		Tested	Detected	Range
1	Flours[1)]	51	1	N.D.[2)]~0.95
2	Bakery	59	0	N.D.

[1)]Wheat flour, flying flour, and making mix are included.
[2)]N.D.: not detected means below limits of detection (0.02 mg/kg).

었다고 보고한 Osborne[18]의 결과에 비해 평균 7% 정도의 회수율이 개선되었다.

국내 유통 식품 중 ADA 함량 분석

확립된 ADA의 분석법으로 국내 유통 중인 51개 밀가루 및 59개의 빵 등에 대하여 ADA의 함량분석 결과는 Table 5에 나타내었다. 밀가루 중 ADA의 함량 분석 결과 밀가루 및 밀가루가 주원료인 튀김가루 51건 중 1건에서 ADA가 검출되었으나(검출율 : 2%), 빵류에서는 검출되지 않았다. 현행 식품첨가물공전의 사용기준에서 ADA는 밀가루 1 kg 당 45 mg 미만으로 사용 가능하므로 밀가루에서 검출된 ADA의 양은 사용기준에 적합하였다. 그러나 ADA의 안정성을 고려한다면 실제 사용한 ADA의 함량은 검출량 보다 높았을 것으로 판단되며, 보관 유통과정 중 biurea 등으로 분해가 일어나 검출된 양이 적었을 것으로 사료된다.

분석에 사용된 밀가루 시료는 대부분 국산 제품으로 ADA를 모두 함유하고 있지 않았다. 이는 실질적으로 ADA가 밀가루 개량제 보다는 빵 제조시의 반죽의 물리적 성질을 좋게 하기 위한 반죽개량제로 사용되기 때문으로 예상되며, 빵에서 보다 많은 검출률을 나타낼 것으로 예상되어진다. 그러나 빵 분석에서 ADA가 모두 검출되지 않은 결과를 나타내었으며, 이는 ADA가 빵의 제조과정 중에서 biurea 등으로 분해되었기 때문으로 사료된다[17].

감사의 글

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

요 약

ADA는 밀가루 개량제로 사용기준이 설정되어 있는 식품첨가물이나 이의 사용량과 잔류량을 확인할 수 있는 시험분석법이 확립되어 있지 않은 상태임으로 사전・사후 안전관리를 위해서 ADA를 밀가루 및 빵류에서 분석 가능한 방법을 확립하고자 하였다.

식품 중 ADA의 분석을 위하여 컬럼, 이동상 조건, 전처리 조건, 기기조건 등을 검토하여 HPLC를 이용한 분석법을 확립하였으며, 개발된 분석법의 회수율, 분석법의 유효성 검증 등을 검토하였다. 회수율은 91.93~97.54%로 양호하였으며, 검출한계(LOD)는 0.02 mg/L의 농도이었고, 정량한계(LOQ)는 0.05 mg/L의 농도이었다. 확립된 분석법에 의해 밀가루 등 51건, 빵류 59건에 대하여 ADA 함량을 분석한 결과 밀가루 1건에서 0.95 mg/kg의 농도로 검출되었으나 (검출율 : 2%), 빵류에서는 검출되지 않았다. 검출된 ADA의 양은 사용기준인 밀가루 1 kg당 45 mg에 비하여 매우 낮은 값을 나타내었다. 본 연구를 통하여 확립된 식품 중 ADA 분석법으로 밀가루, 빵류 등의 가공식품에 대한 ADA의 사후관리에 기여할 것으로 본다.

참고문헌

1. Korea Food and Drug Administration: Food Additives Code. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea, pp 233-234 (2009).
2. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation: Analysis of food additives in foods. (2009).
3. United States Food and Drug Administration: 21CFR172. 806. Azodicarbonamide(http://www.access -data.fda.gov/scripts/cdrh/ cfdocs/cfcfr).
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. 69th meeting. *Electronic Publishing Policy and Support Branch Communication Division - FAO*. 2006.
6. Weak E.D., Hoseney R.C., Seib P.A.: Determination of azodicarbonamide in wheat flour. *Cereal Chem.*, **53**, 881-889 (1976).
7. Becalski A., Lau B.P.Y., Lewis D., Seaman S.W.: Semicarbazide formation in azodicarbonamide treated flour - A model study. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5730-5734 (2004).
8. Noonan G.O., Warner C.R., Hsu W., Begley T.H., Perfetti G.A., Diachenko G.W.: Ther determination of semicarbazide (N-aminourea) in commercial bread products by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4680-4685 (2005).
9. de la Calle M.B, 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 P.P.J., Beumer B., Rhijn J.A.V.: The determination of biurea: A novel method to discriminate between nitrofuran and azodicarbonamide use in food products. *Analytica Chemica 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 M.J., Massey R.C., 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. Weak, E.D., Hoseney, R.C., Seib, P.A.: Determination of azodicarbonamide in wheat flour. *Cereal Chem.,* **53**, 881-889 (1976).
14. Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D., Seaman, S.W.: Semicarbazide formation in azodicarbonamide treated flour - A model study. *J Agric. Food Chem.,* **52**, 5730-5734 (2004).
15. de la Calle, M.B., 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).
16. Mulder, P.P.J., Beumer, B., Rhijn, J.A.V.: The determination of biurea : A novel method to discriminate between nitrofuran and azodicarbonamide use in food products. *Analytica Chemica Acta,* **586**, 366-373 (2007).
17. Stadler, R.H., Mottier, R., Guy, P., Gremaud, E., Varga, N., Lalljie, S., Kintscher, J., Dudler, V., Read, W.A., Castle, L.: Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide used in the gaskets of certain food jars. *Analyst,* **129**, 276-281 (2004).
18. Osborne, B.G.: High performance liquid chromatography of azodicarbonamide. *Journal of Chromatography,* **368**, 401-404 (1986).
19. de Stefanis, V.A.: Analysis of azodicarbonamide in wheat flour by liquid chromatography. *Cereal Chem.,* **65**, 52-55 (1988).
20. Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D., Seaman, S.: Semicarbazide in Canadian bakery products. *Food Additives and Contaminants,* **23**, 107-109 (2006).
21. Pereira, A.S., Donato, J.L., De Nucci, G.: Implications of the use of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone contamination in coated products. *Food Additives and Cotaminats,* **21**, 63-69 (2004).
22. Conant, J.B., Bartlett, P.D.: A quantitative study of semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.,* **54**, 2881-2899 (1932).
23. Canas, B.J., Diacheoko, G.W., Nyman, P.J.: Ethyl carbamate levels resulting from azodicarbonamide use in bread. *Food Additives and Contaminants,* **14**, 89-94 (1997).
24. Dennis, M.J., Massey, R.C., 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 Additives and Contaminats,* **14**, 95-100 (1997).
25. La, I.J., Lee, M.C., Park, H.D., Kim, K.P.: 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. ICH (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/381/9591995).