

Semicarbazide dans les denrées alimentaires Bilan réalisé par l'Afssa

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 23 octobre 2003 par la Direction générale de l'alimentation, la Direction générale de la santé et la Direction générale de la concurrence (DGCCRF) de la consommation et de la répression des fraudes, d'une saisine relative à la présence de Semicarbazide dans des denrées alimentaires.

Ce dossier étant traité dans le cadre européen de l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire sur le fondement de données issues de l'industrie dans une configuration européenne, l'Afssa a focalisé son expertise sur les estimations de l'exposition nationale à partir de dosages réalisés par les laboratoires de Bordeaux (DGCCRF), de Fougères (Afssa) et de l'industrie.

En liaison étroite avec le Comité d'Experts Spécialisé « Matériaux au Contact des Denrées Alimentaires » et à travers plusieurs auditions des industriels (Association Nationale des Industries Alimentaires, Joint Industry Group), l'Afssa a par ailleurs suivi la progression des travaux engagés au niveau communautaire sous trois aspects principaux :

- examen des données toxicologiques complémentaires recueillies,
- mise en place des travaux de substitution de l'azodicarbonamide,
- origines de la semicarbazide dans les aliments.

Est présenté ci-dessous le bilan réalisé sur le suivi de cette substance.

Selon les dernières informations recueillies, la substitution de l'azodicarbonamide par du bicarbonate de sodium devrait être effective à l'échéance du 2 août 2005.

1 Contexte

L'Afssa a été informée le 24 juillet 2003 par l'Association nationale des industries alimentaires (ANIA) de la **présence de semicarbazide dans des aliments emballés destinés aux enfants en bas âge** et aux adultes. La semicarbazide (SEM) a été détecté dans des aliments dans le cadre de contrôle régulier de nitrofurazone, dont il est le métabolite utilisé comme traceur. La nitrofurazone est en effet un produit interdit (d'où les campagnes de surveillance) mais que l'on peut parfois trouver en tant qu'antiseptique pour des usages vétérinaires.

L'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (AESA/EFSA), saisie par la Commission européenne, a procédé à l'évaluation du dossier constitué par l'industrie dans une configuration européenne et a rendu un avis préliminaire en juillet 2003 ¹, actualisé en octobre 2003 (avec la publication d'un « question-réponse ») concluant :

- que le risque associé à la consommation de semicarbazide était très faible,
- qu'il subsistait des incertitudes scientifiques notamment d'ordre toxicologique justifiant des travaux complémentaires,
- incitant à la réduction et si possible à l'élimination du SEM des emballages alimentaires.

Des études de toxicogénétique complémentaires ont été mises en ligne sur le site internet de l'AESA.

L'interdiction de l'usage de l'azodicarbonamide, précurseur de la semicarbazide, à partir du 2 août 2005 a ultérieurement été décidée par la Directive 2004/1/CE du 6 janvier 2004.

¹ Press release du 15 octobre 2003 de l'AESA associé à la mise à jour du 13 février 2004

2 La Semicarbazide et son origine dans les aliments

Numéro CAS : 57-56-7

Formule développée : H₂N-CO-NH-NH₂

Masse molaire : 75,07 g/mol

Différentes hypothèses sur l'origine du SEM dans les aliments ont été émises :

- Un produit de dégradation de la nitrofurazone employée comme antiseptique vétérinaire. Les aliments emballés dans lesquels la semicarbazide a été détectée n'impliquant pas l'utilisation de nitrofurazone, cette origine a été écartée.
- Un artefact analytique. Cette origine a aussi été écartée.
- **Un produit de dégradation de l'azodicarbonamide**, n° CAS 123-77-3, utilisé comme **agent gonflant** à la dose de 0,2 à 0,5 % en masse **de joints en polychlorure de vinyle des emballages** de type « pop ». Ces joints sont destinés à assurer l'étanchéité entre les pots en verre et les couvercles.

En Europe, l'emploi d'azodicarbonamide dans les emballages est autorisé uniquement comme agent gonflant. La formation de semicarbazide n'était pas connue lors de l'évaluation de l'azodicarbonamide.

Cette hypothèse est devenue la plus probable lorsque la semicarbazide a été retrouvée dans des aliments qui n'ont pas pu être traités au nitrofurazone (légumes, fruits). La semicarbazide migre des joints vers les aliments emballés. La condensation de gouttelettes d'eau sur le couvercle lors de l'étape de stérilisation ou de la pasteurisation pourrait favoriser cette migration.

3- Exposition de la population française

Afin d'estimer les expositions, les niveaux de consommation de petits pots ont d'abord été déterminés puis les teneurs en SEM ont été quantifiées dans les aliments emballés dans les petits pots.

Les principaux résultats montrent que :

- Les enfants en bas âge représentent la population la plus exposée compte-tenu du rapport (R) de la consommation alimentaire versus poids corporel (PC).

Les principales données de consommation française des enfants en bas âge de moins de 3 mois à 12 mois issues de l'enquête menée par la Sofres au premier trimestre 1997 (Annexe 1) sont repris dans le tableau ci-dessous.

	< 3 mois	4-6 mois	7-9 mois	10-12 mois
Poids corporel (PC)	5,0	7,0	8,3	9,6
% Consommateurs de petits pots pour la population considérée	39,7	92,1	96,1	78,3
Consommation moyenne en petits pots (hors [lait + autres]) parmi les consommateurs de petits pots (g)	62,5	180,9	195,3	213,0
Consommation moyenne en petits pots rapportée au PC (R) (g)	13	26	24	22
Consommation P95 en petits pots (hors [lait + autres]) parmi les consommateurs de petits pots (g)	260,0	411,7	443,3	533,3
Consommation P95 en petits pots rapportée au PC (R) (g/kg)	52	59	53	56

Parmi les enfants de zéro à douze mois, les rapports [consommation des denrées emballées dans des petits pots/kg PC] sont très voisins d'une tranche d'âge à l'autre : ils varient pour les 52 à 59 g de denrées/kg PC (95^{ème} percentile de la consommation de petits pots).

La tranche d'âge la plus exposée au regard de sa consommation alimentaire versus son poids corporel est celle de 4 à 6 mois. Ce rapport est de 59 g de denrées /kg PC (95ème percentile) (Annexe 1).

- Une enquête nationale réalisée par les laboratoires de Fougères (Afssa) et de Bordeaux (DGCCRF) a permis de déterminer les teneurs en SEM dans les aliments (Annexe 2 et 3).

Les principales données de contamination des aliments pour bébés et adultes emballés dans des pots dont l'étanchéité est assurée en utilisant de l'azodicarbobnamide, sont repris dans le tableau ci-dessous :

	Nombre Echantillons	Moyenne (µg/kg Al.)	Encadrement (µg/kg Al.)	Limite de détection (µg/kg Al.)	P ₉₅ (µg/kg Al.)
<i>Petits pots pour bébé</i>					
Industrie	68	11	[nd ; 27]	0,5	21
DGCCRF	21	17	[nd ; 36]	5	29
Afssa	40	10	[7 ; 15]	0,5	15
Toutes sources	129	12	[nd ; 36]		23
<i>Aliments pour adulte</i>					
Industrie	45	1	[nd ; 3]	0,5	2,5
DGCCRF	11	8	[nd ; 20]	5	20
Toutes sources	56	2	[nd ; 20]		11

Pour les données de la DGCCRF et de l'industrie, la moyenne est calculée en considérant la valeur de la limite de détection lorsque la semicarbazide est non détectée (nd). Les limites de détections n'étant pas connues pour l'industrie, elle est approchée à partir des valeurs basses des dosages.

Les résultats confirment que les concentrations en semicarbazide dans les aliments pour bébé sont supérieures à celles des aliments pour adultes. Ces valeurs plus faibles pourraient s'expliquer par le type de fermeture et de joint (généralement « Twist off » pour les denrées pour adultes et « Press on twist off » pour les petits pots, ce dernier permet de garantir une sécurité microbiologique supérieure).

A noter que les petits pots de légumes et de viandes sont plus contaminés que les petits pots de fruits. Cette différence s'expliquerait par des traitements différents (température, pression) : pasteurisation pour les fruits et stérilisation pour les viandes et légumes.

Au bilan, le taux de contamination des petits pots pour bébé obtenu en France est en moyenne de 26 µg/kg d'aliment (P95). Ce taux est du même ordre de grandeur que les valeurs retenues par l'industrie européenne (20 µg/kg d'aliment, P95) et par l'AESA (maximum de 25 µg/kg d'aliment). Toutes données confondues (129 échantillons), la concentration maximale dans les petits pots pour bébé est de 36 µg SEM/kg d'aliment, la moyenne est de 12 µg SEM /kg d'aliments, le percentile 95 de 23 µg SEM /kg d'aliments.

La **dose maximale d'exposition de SEM** dans les aliments pour bébé ainsi établie à partir des données de contamination et de consommation de la population française serait de **1,4 µg SEM/kg poids corporel/jour** (cf tableau ci-dessous) et autour de 2 µg/kg poids corporel/jour selon l'AESA².

P95 de la Concentration (µg SEM/kg Aliments)	P95 de la Consommation enfant en bas âge de 4-6 mois (g/jour)	Poids des enfants en bas âge de 4-6 mois (kg)	Rapport Consommation/ Poids Corporel (g/kg PC)	Exposition (µg/kg PC/jour)
23	412	7	59	1,4

La méthode d'estimation de l'exposition retenue ici est très conservatrice car elle associe un percentile élevé de contamination et un percentile élevé de consommation. Elle suppose un fort consommateur qui serait exposé systématiquement aux aliments les plus fortement contaminés (pire des cas).

² Additional advice on semicarbazide, in particular related to baby food - *Ad hoc* expert group - meeting 9 october 2003.

En conclusion, les résultats présentés ci-dessus montrent que **l'exposition des consommateurs français n'est pas significativement différente de celle estimée par l'Autorité européenne.**

4- Toxicité de la semicarbazide

Depuis le début de l'évaluation, la plupart des données relatives à la toxicité et la génotoxicité du SEM ont été recueillies et examinées par l'Afssa, notamment les rapports originaux des dernières études de génotoxicité réalisées en 2003 et 2004 par l'AESA et l'industrie (JIG).

Au bilan, il ressort que :

- ❑ la semicarbazide peut être considérée comme toxique par ingestion (DL50, voie orale, souris = 176 mg/kg PC),
- ❑ la semicarbazide est un agent mutagène direct *in vitro* : il induit des mutations géniques dans les bactéries et les cellules de mammifères en culture, essentiellement sans activation métabolique exogène,
- ❑ la semicarbazide est potentiellement un agent aneuploïdogène indirect *in vitro* : il induit une augmentation réversible de la fréquence des endoréplifications dans certaines lignées cellulaires en culture en présence d'activation métabolique,
- ❑ la semicarbazide n'est pas clastogène *in vitro* : il n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères en culture,
- ❑ la semicarbazide n'induit pas de dommages primaires à l'ADN : absence de réparation de l'ADN dans les hépatocytes de rongeurs en culture après un traitement *in vitro* ou *ex vivo* (tests UDS),
- ❑ dans des études dont la valeur scientifique est très limitée,
 - la semicarbazide n'est pas cancérogène chez le rat,
 - la semicarbazide est, au plus, un agent cancérogène faible chez la souris (sous réserve que l'effet ne soit pas un artefact en raison du faible nombre d'animaux exposés et de la dose administrée nettement toxique).
- ❑ Pour les raisons exposées ci-dessus, le calcul d'une TD50 à partir de l'étude de cancérogenèse chez la souris n'est pas pertinent.

Dans son communiqué de presse du 15 octobre 2003, l'AESA avait conclu, que la semicarbazide est faiblement génotoxique *in vitro* et faiblement cancérogène². Au regard des études disponibles depuis, seule la mutagenèse *in vitro* est actuellement avérée.

5- Perspectives réglementaires pour l'azodicarbonamide

A dater du 2 août 2005, l'emploi du précurseur de la semicarbazide, **l'azodicarbonamide** initialement autorisé dans la directive 2002/72/CE **sera interdit dans les matériaux au contact des denrées alimentaires** par la Commission européenne (Directive 2004/1/CE du 6 janvier 2004).

6- Substitution de l'azodicarbonamide, agent gonflant des joints PVC

D'après les informations de l'ANIA³, l'azodicarbonamide devrait être remplacé avant la date d'interdiction du 2 août 2005 fixée par la directive 2004/1/CE. Le substituant retenu est le **bicarbonate de sodium**.

Les essais engagés depuis septembre 2003 se sont avérés jusqu'alors satisfaisants. Trois formulations du joint ont été testées :

- ❑ Les tests réalisés sur une première génération de capsules à partir de septembre 2003 (environ 2 000 000 de pots testés) ont été analysés en novembre 2003. Ces tests ont montré un taux de « dé-pop » (signe de défaut d'étanchéité) après deux mois de vieillissement supérieur à la norme libératrice de 1/ 10 000.

³ Réunion du 17 mars et 22 octobre 2004.

- ❑ Les tests réalisés sur une deuxième génération de capsules, après amélioration du process, de décembre 2003 à février 2004 (500 000 pots) ont montré un taux de « dé-pop » très proche de l'objectif après 6 semaines de vieillissement (1 à 5/ 10 000).
- ❑ Les tests réalisés sur une troisième génération de capsules, après ajustement de paramètres comme les agents nucléants et dessiccants sont en cours depuis début juillet 2004 pour une durée de 12 mois. Ils portent sur 1,6 millions de pots stérilisés et 300 000 pots pasteurisés. Après quelques mois de vieillissement, le taux de « dé-pop » est satisfaisant puisque inférieure à la norme de 1/ 10 000 (0,3/ 10 000).

Selon les industriels, la troisième génération devrait permettre de satisfaire pleinement les exigences sanitaires liées à l'étanchéité et aux risques microbiologiques et donc de permettre la substitution de l'azodicarbonamide.

Actuellement, certains industriels ont déjà substitué l'azodicarbonamide des joints des couvercles d'une grande partie de la production de pots destinés aux enfants en bas âge. La totalité de leur production ne devrait plus employer d'azodicarbonamide avant la date butoir du 2 août 2005.

7- Autres usages de l'azodicarbonamide

Excepté l'emploi d'azodicarbonamide comme agent gonflant, l'Afssa n'a recueilli à aucune information après consultation de l'ANIA et du Syndicat des Producteurs de Matières Plastiques sur d'éventuelles autres utilisations dans des matériaux au contact alimentaire.

Par ailleurs, l'emploi de l'azodicarbonamide est autorisé comme agent de blanchiment de farine aux Etats-Unis (limite de 45 mg/kg de farine) et au Brésil (limite de 40 mg/kg de farine). Cet usage n'est pas autorisé en Europe.

8- Autres sources de semicarbazide dans les aliments

- ❑ L'azodicarbonamide

La semicarbazide étant un produit de dégradation de l'azodicarbonamide, toute autre utilisation de l'azodicarbonamide réunissant les conditions de formation de la semicarbazide est susceptible de conduire à la formation de semicarbazide. Quelques auteurs notent la formation de semicarbazide suite à la cuisson de farine blanchie à l'azodicarbonamide ⁴. Cependant, l'emploi de l'azodicarbonamide pour cet usage n'est pas autorisé en Europe.
- ❑ La présence de semicarbazide rapportée ou évoquée au niveau communautaire dans certains produits alimentaire a donné lieu à des travaux de recherche. Peuvent ainsi être cités :
 - Les traitements oxydants

R. Gatermann et al.⁵ (Eurofins) ont présenté (Prague, 5-7 novembre 2003) des résultats expérimentaux montrant la formation de semicarbazide lors de traitement par l'hypochlorite de sodium (1) d'aliments et (2) d'acides aminés.

L'hypochlorite de sodium est autorisé (1) au contact de matériaux destinés au contact alimentaire comme produit de nettoyage (désinfectant) mais avec rinçage ⁶, (2) au contact d'aliment comme auxiliaire technologique (désinfectant, agent de blanchiment) et (3) au contact de l'eau de consommation comme produit pour les traitements de potabilisation (désinfectant) ⁷. Cependant, les concentrations maximales en hypochlorite de sodium utilisées

⁴ A.S. Pereira et al., Implication of the use of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone contamination in coated product, *Food additives and Contaminants*, 2004, 21 : 63-69 ; A. Becalski et al., Semicarbazide formation in azodicarbonamide-treated flour : a model study, *Journal of Agricultural and food chemistry*, 2004, 52 (18) : 5730-5734. *Articles non lus*

⁵ R. Gatermann, K. Hoenicke et M. Mandix (2003), Formation of semicarbazide (SEM) from natural compounds in different kind of food products ; Communication - Eurofins Prague, November 5-7 2003 ; *Wiertz-Eggert-Jörissen GmbH, Stenzelring 14 b, D-21107 Hamburg, Germany*.

⁶ Arrêté du 8 septembre 1999 relatif aux procédés et produits utilisés pour le nettoyage des matériaux et objets destinés à entrer au contact avec des denrées, produits et boissons pour l'alimentation de l'homme et des animaux.

⁷ Circulaire du 7 mai 1990 relative aux produits et procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine.

seraient plus faibles d'un facteur 1000 par rapport aux conditions expérimentales de l'étude citée.

K. Hoenicke, R. Gatermann et *al.*⁸ montrent que le traitement par l'hypochlorite de sodium à plus de 0,05 % de chlore actif de carraghénanes mais aussi de poudre d'œufs conduit à la formation de semicarbazide.

Le traitement oxydant, particulièrement par l'hypochlorite de sodium semble représenter un risque de formation de semicarbazide. Cependant, excepté pour la créatine, les carraghénanes et la poudre d'œuf, la réaction nécessite de fortes doses (12 %) non représentatives des usages autorisés pour l'hypochlorite de sodium.

- La présence naturelle dans certains aliments

Il semblerait que la semicarbazide puisse être présente à l'état naturel en très faible quantité dans les algues (maximum de 2,2 µg/kg de carraghénane), les crevettes, les œufs ou encore le lait en poudre⁸. Néanmoins cette voie d'exposition resterait marginale et l'origine naturelle reste à confirmer.

- La nitrofurazone

La semicarbazide est un métabolite utilisé comme traceur de la nitrofurazone, antiseptique pour usages vétérinaires interdit en Europe.

L'interprétation d'un résultat positif en semicarbazide doit donc prendre en compte les différentes origines possibles. Un document de travail élaboré dans ce cadre par le laboratoire Afssa de Fougères (Laboratoire Communautaire de Référence) à la demande de la Commission européenne est joint en annexe 4.

⁸ K. Hoenicke, R. Gatermann et *al.*, Formation of semicarbazide (SEM) in food by hypochlorite treatment : is SEM a specific marker for nitrofurazone base ? *Food Additives and Contaminants*, 2004, Vol. 21, N°6 : 526-537

ANNEXE 1 : DONNEES DE CONSOMMATION FRANÇAISE (AFSSA - OCA)

Données de consommation de petits pots chez les bébés âgés de moins de 12 mois en vue de l'évaluation du risque sanitaire lié à la présence de semicarbazide

1. Objectif

Cette note a pour objectif de fournir une estimation de la consommation alimentaire de petits pots (légumes, légumes+viandes, fruits) dans l'alimentation des bébés âgés de moins de 12 mois.

2. Données de consommation alimentaire

L'échantillon étudié est constitué de 658 enfants âgés de 1 à 30 mois. L'échantillon est représentatif des familles françaises métropolitaines ayant des enfants de même âge en termes de région, taille de commune et catégorie socio-professionnelle du chef de ménage. L'enquête a été réalisée sur le terrain au premier semestre de 1997, par la Sofres. Les parents de l'enfant étudié ont noté durant 3 jours consécutifs toutes les prises alimentaires de leur enfant.

3. Résultats

3.1. Consommation alimentaire

Conformément à la demande, les résultats présentés dans cette note portent sur la tranche d'âge 1 à 12 mois qui comprend un effectif de 444 enfants.

Les consommations alimentaires sont exprimés en grammes par jour.

a. Enfants de moins de 3 mois : Effectif = 68

Pendant cette période, l'alimentation est essentiellement représentée par du lait (maternel ou industriel).

Catégorie alimentaire	Ensemble			Taux de consommateurs (%)	Seuls consommateurs		
	Moyenne (g/j)	Ecart-type (g/j)	95è perc. (g/j)		Moyenne (g/j)	Ecart-type (g/j)	95è perc. (g/j)
Tous aliments confondus (lait compris)	830.8	156.1	1164.0	100.0%	830.8	156.1	1164.0
dont petits pots :	24.8	60.4	130.0	39.7%	62.5	83.3	260.0
Légumes	9.3	31.0	81.5	10.3%	90.7	46.2	150.0
Légumes et viande	1.4	8.7	0.0	2.9%	47.6	26.9	66.7
Fruits et desserts	10.3	24.8	65.0	26.5%	38.8	35.4	130.0
Jus de fruits pour bébés	3.8	14.4	20.0	16.2%	23.5	29.6	86.7

Enquête bébés-Sofres 1997 : Traitement OCA

Guide de lecture : les enfants de moins de 3 mois consomment en moyenne 24.8 g par jour d'aliments en petits pots. Sur 3 jours d'enquête, 39.7% de la population de moins de 3 mois a consommé des petits pots : pour ces seuls consommateurs, la consommation moyenne s'établit à 62.5 g/jour.

b. Enfants de 4 à 6 mois : Effectif = 178

Le passage de l'alimentation liquide à semi-liquide (purée de légumes, compote de fruits) s'effectue le plus souvent pendant cette période.

Catégorie alimentaire	Ensemble			Taux de consommateurs (%)	Seuls consommateurs		
	Moyenne (g/j)	Ecart-type (g/j)	95 ^e perc. (g/j)		Moyenne (g/j)	Ecart-type (g/j)	95 ^e perc. (g/j)
Tous aliments confondus (lait compris)	966.9	159.1	1268.1	100.0%	966.9	159.1	1268.1
dont petits pots :	166.6	125.9	411.7	92.1%	180.9	121.0	411.7
Légumes	40.6	45.1	130.0	61.8%	65.7	40.4	130.0
Légumes et viande	29.5	52.1	150.0	31.5%	93.6	51.2	196.7
Fruits et desserts	86.5	75.0	220.0	82.6%	104.8	69.9	230.0
Jus de fruits pour bébés	10.0	28.0	56.7	30.9%	32.5	42.7	125.0

Enquête bébés-Sofres 1997 : Traitement OCA

Guide de lecture : les enfants âgés de 4 à 6 mois consomment en moyenne 166.6 g par jour d'aliments en petits pots. Sur 3 jours d'enquête, 92.1% de la population de 4 à 6 mois a consommé des petits pots : pour ces seuls consommateurs, la consommation moyenne s'établit à 180.9 g/jour.

c. Enfants de 7 à 9 mois : Effectif = 129

Catégorie alimentaire	Ensemble			Taux de consommateurs (%)	Seuls consommateurs		
	Moyenne (g/j)	Ecart-type (g/j)	95 ^e perc. (g/j)		Moyenne (g/j)	Ecart-type (g/j)	95 ^e perc. (g/j)
Tous aliments confondus (lait compris)	1100.7	210.9	1503.2	100.0%	1100.7	210.9	1503.2
dont petits pots :	187.8	144.3	443.3	96.1%	195.3	142.0	443.3
Légumes	31.0	56.4	130.0	43.4%	71.4	66.8	210.0
Légumes et viande	54.4	68.4	200.0	54.3%	100.2	63.3	200.0
Fruits et desserts	94.0	82.1	218.3	84.5%	111.2	77.8	231.7
Jus de fruits pour bébés	8.5	18.2	50.0	28.7%	29.8	23.0	73.3

Enquête bébés-Sofres 1997 : Traitement OCA

Guide de lecture : les enfants de 7 à 9 mois consomment en moyenne 187.8 g par jour d'aliments en petits pots. Sur 3 jours d'enquête, 96.1% de la population de 7 à 9 mois a consommé des petits pots : pour ces seuls consommateurs, la consommation moyenne s'établit à 195.3 g/jour.

d. Enfants de 10 à 12 mois : Effectif = 69

Catégorie alimentaire	Ensemble			Taux de consommateurs (%)	Seuls consommateurs		
	Moyenne (g/j)	Ecart-type (g/j)	95 ^e perc. (g/j)		Moyenne (g/j)	Ecart-type (g/j)	95 ^e perc. (g/j)
Tous aliments confondus (lait compris)	1143.5	241.4	1527.7	100.0%	1143.5	241.4	1527.7
dont petits pots :	166.7	163.4	530.0	78.3%	213.0	155.6	533.3
Légumes	19.9	42.4	133.3	34.8%	57.3	55.5	143.3
Légumes et viande	54.4	83.0	200.0	43.5%	125.0	83.7	276.7
Fruits et desserts	78.0	82.7	255.0	65.2%	119.6	74.1	300.0
Jus de fruits pour bébés	14.5	33.7	80.0	23.2%	62.4	44.5	183.3

Enquête bébés-Sofres 1997 : Traitement OCA

Guide de lecture : les enfants de 10 à 12 mois consomment en moyenne 166.7 g par jour d'aliments en petits pots. Sur 3 jours d'enquête, 78.3% de la population de 10 à 12 mois a consommé des petits pots : pour ces seuls consommateurs, la consommation moyenne s'établit à 213 g/jour.

3.2. Poids moyen des enfants par classe d'âge (en kg)

Classe d'âge	Moyenne	Écart-type
3 mois et moins	5.0	1.0
4 à 6 mois	7.0	0.9
7 à 9 mois	8.3	1.0
10 à 12 mois	9.6	1.3

Enquête bébés-Sofres 1997 : Traitement OCA

ANNEXE 2 : DONNEES DE CONTAMINATION FRANÇAISE (AFSSA FOUGERES - LERMVD)

Recherche de semicarbazide dans les aliments pour bébé

RAPPORT INTERNE - AFSSA-LERMVD du 18 novembre 2003

- **Questions posées**

1. La méthode LMV/03/02 version1 est-elle adaptée à l'analyse du semicarbazide (SEM) dans les divers produits alimentaires transformés pour bébés (viande, poisson, légume, fruit, etc. ...) ou bien nécessite-t-elle une mise au point ?
2. Quelle quantité de SEM peut-on déterminer en fonction des compositions ?
3. S'agit-il de SEM libre ou de SEM lié ?
4. Y-a-t-il diffusion depuis le joint d'étanchéité en surface du produit consommable ou bien le SEM diffuse-t-il en volume dans l'ensemble du produit ?

- **Introduction**

- la priorité d'analyse de métabolites de nitrofuranes ayant été donnée à un plan d'analyse de petits pots de légumes et de fruits, la première approche analytique a été de considérer le protocole existant appliqué tel que aux purées de légumes et de fruits de marque A et B.
- le protocole mis en œuvre (LMV/03/02 version 1) nécessite 2 journées d'analyses par lot de 18 échantillons au maximum analysés ensemble. Il comprend une préparation de l'échantillon, une hydrolyse acide de 16 heures puis une extraction-purification et une analyse chromatographique avec détection par spectrométrie de masse en tandem. Ce protocole est employé dans le cadre du contrôle de routine des échantillons de produits alimentaires d'origine animale prélevés par les services vétérinaires (viande, poisson).
- le plan de l'étude est le suivant :
 - 6 pots pour la mise au point de la méthode (3 A et 3 B)
 - 20 pots A (5 séries de 4 pots de même lot)
 - 3 séries de pots de 200g (légumes)
 - 2 séries de pots de 130g (fruits)
 - 20 pots B (5 séries de 4 pots de même lot)
 - idem
 - idem

Pour chaque série de pots :

- analyser 3 pots « tel que » pour la répétabilité
- analyser le 4^e après chauffage au bain-marie et agitation (comme pour donner à un bébé)

Note 1 : un pot de A (série 2) (lot : 15/07/04) et un pot de B (série 6) (lot : 10/2004) ne sont pas du même lot que les 3 autres

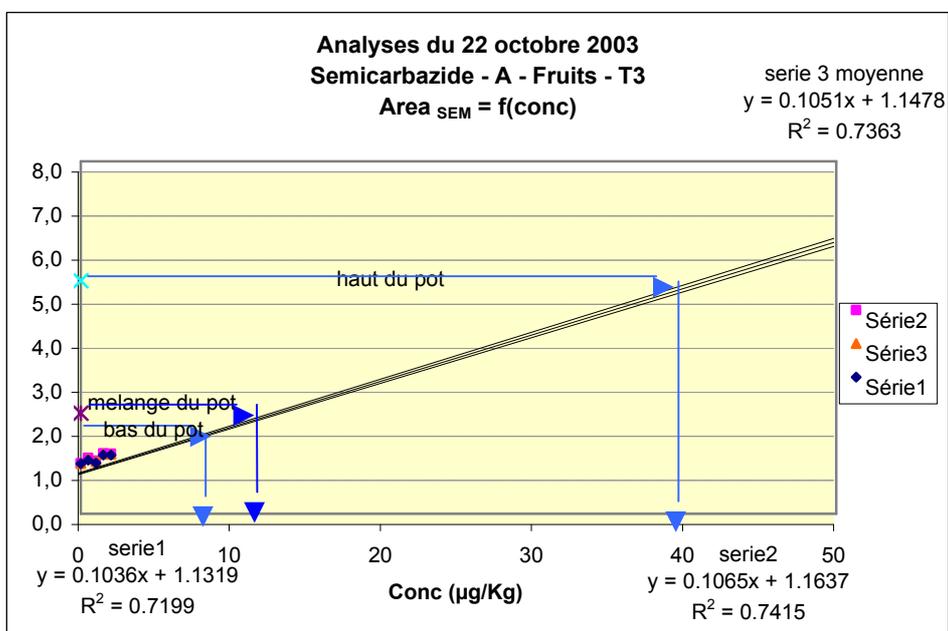
Note 2 : le contenu entier de chaque pot doit être homogénéisé avant prélèvement pour analyse

● 1^{ère} étape : Tests préliminaires

- Quatre pots ont été analysés suivant le protocole LMV/03/02 version1, identifiés comme suit :
 - pot T1 : A « Légumes » daté au 15/09/2004
 - pot T2 : B « Légumes » daté au 30/04/2005
 - pot T3 : A « Fruits » daté au 19/02/2005
 - pot T4 : B « Fruits » daté au 26/06/05

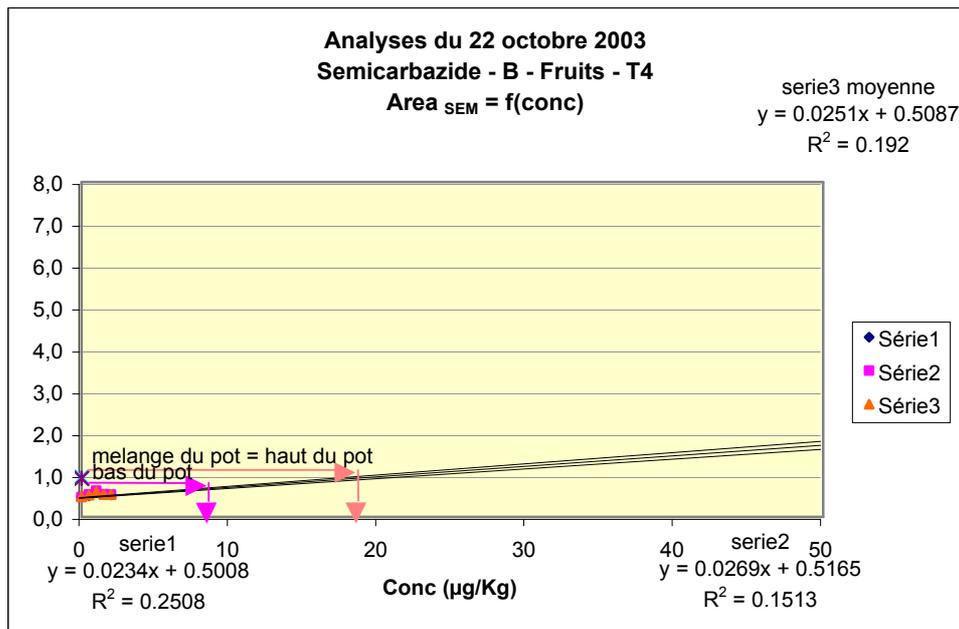
- Résultats sur pot T3

<i>Pot Fruits T3 A</i>			
	Serie 1	Serie2	Serie 3
Concentration (µg/kg Aliment)	(Tr1)	(Tr2)	Moy (Tr1 + Tr2)
Mélange du pot	11,00	10,60	10,80
Haut du pot	40,08	39,59	
Bas du pot	8,31	8,23	



- Résultats sur pot T4

Pot Fruits T4 B			
	Serie 1	Serie2	Serie 3
Concentration (µg/kg Aliment)	Tr1	Tr2	Moy Tr1 Tr2
Mélange	19,82	15,93	17,74
Haut du pot	18,11	15,12	
Bas du pot	9,25	8,14	



- les résultats montrent que :

1. l'analyse des métabolites de nitrofuranes peut s'envisager dans les produits alimentaires transformés pour bébés ;
2. le SEM est présent dans l'ensemble des 4 pots analysés (type légumes comme type fruits) ;
3. les analyses sur petits pots de fruits montrent que le SEM est 3 à 4 fois plus concentré dans le premier tiers du pot comparé au dernier tiers montrant une diffusion du SEM du haut vers le bas (possible confirmation de la mise en cause du joint du couvercle) ;
4. la quantité de SEM ne peut être estimée que de manière très imprécise dans cette 1^{ère} étape du fait d'une calibration non adaptée à la quantité très supérieure (10 à 40 µg/Kg suivant les analyses réalisées soit sur mélange soit sur tiers de pot ...) à la gamme d'analyse du protocole LMV/03/02 version 1 (0,5 à 2 µg/Kg) ; de plus, l'utilisation d'un étalonnage cohérent sur petits pots ne sera envisageable qu'après avoir trouvé une matrice constituée de purée de légumes ou de fruits en petit pot ou sous autre conditionnement mais exempte de SEM ;
5. le SEM trouvé n'est pas d'origine pharmacologique suite à traitement à la nitrofurazone et métabolisation par l'animal traité (SEM = métabolite de la nitrofurazone) puisque les seuls pots analysés contiennent légumes et fruits (ceci rejoint l'hypothèse de la mise en cause de l'ADA (*azodicarbonamide*) l'agent chimique gonflant présent dans les joints d'étanchéité des couvercles de petit pot).

• **2^e étape : Calibration (directe / ajouts dosés)**

La seconde série d'analyses de mise au point de la méthode devra donc permettre de trouver une meilleure calibration pour les analyses du SEM dans les pots :

1. une série d'analyse en ajout dosé sera réalisée en ajustant la calibration sur la gamme 5 à 20 µg/kg et en travaillant sur les pots entiers (homogénéisation de la totalité du produit du petit pot). Les séries T2 (légumes) et T3 (fruits) ont été retenues.

2. une seconde série de calibration sera réalisée sur des produits alimentaires en compote ne provenant pas de petits pots à couvercle plastifié. Les séries T5 (légumes) et T6 (fruit) ont été retenues.

Résultats bruts :

Composé analysé : NP-SEM		ANALYSES du 23 OCTOBRE 2003	
#	Name	Sample Text	Calibration
1	031023- baby food-01	standard 10 µg/Kg	
2	031023 - baby food-02	standard 10 µg/Kg	
3	031023 - baby food-03	Eau	
4	031023 - baby food-16	Blanc T5 - légumes	0
6	031023 - baby food-17	Supp 5 - T5- légumes	5
7	031023 - baby food-18	Supp 10 - T5- légumes	10
8	031023 - baby food-19	Supp 15 - T5- légumes	15
9	031023 - baby food-20	Supp 20 - T5- légumes	20
10	031023 - baby food-21	Eau	
5	031023 - baby food-22	Blanc T6- fruits	0
11	031023 - baby food-23	Supp 5 - T6- fruits	5
12	031023 - baby food-24	Supp 10 - T6 - fruits	10
13	031023 - baby food-25	Supp 15 - T6- fruits	15
14	031023 - baby food-26	Supp 20 - T6- fruits	20
15	031023 - baby food-27	Eau	
16	031023 - baby food-04	T2- Légumes B	0
17	031023 - baby food-05	Supp 5 - T2- Légumes B	5
18	031023 - baby food-06	Supp 10 - T2- Légumes B	10
19	031023 - baby food-07	Supp 15 - T2- Légumes B	15
20	031023 - baby food-08	Supp 20 - T2- Légumes B	20
21	031023 - baby food-09	Eau	
22	031023 - baby food-10	T3- Fruits A	0
23	031023 - baby food-11	Supp 5 - T3- Fruits A	5
24	031023 - baby food-12	Supp 10 - T3- Fruits A	10
25	031023 - baby food-13	Supp 15 - T3- Fruits A	15
26	031023 - baby food-14	Supp 20 - T3- Fruits A	20
27	031023 - baby food-15	Eau	
28	031023 - baby food-28	std 1 µg/Kg	
29	031023 - baby food-29	Eau	

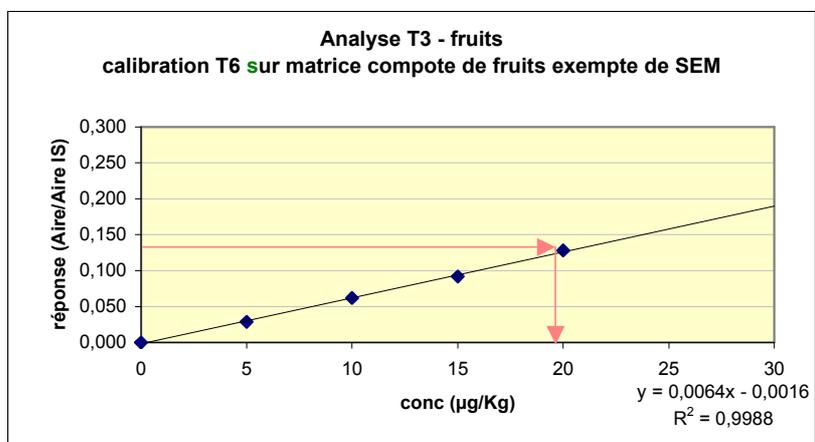
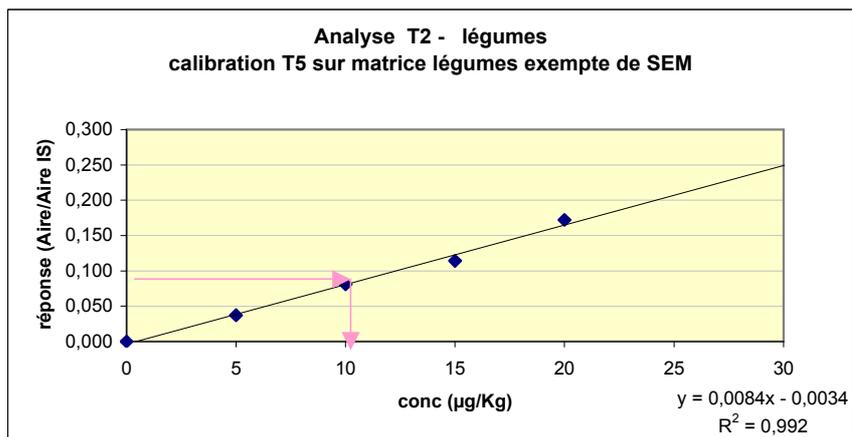
Analyse des résultats :

A - Analyses réalisées en calibration sur 2 matrices exemptes de SEM
(Légumes Surgelés et Sachets de compotes de fruits)

B - Analyses réalisées en calibration sur 2 matrices contenant du SEM
(Pots pour bébés de légumes et de fruits)

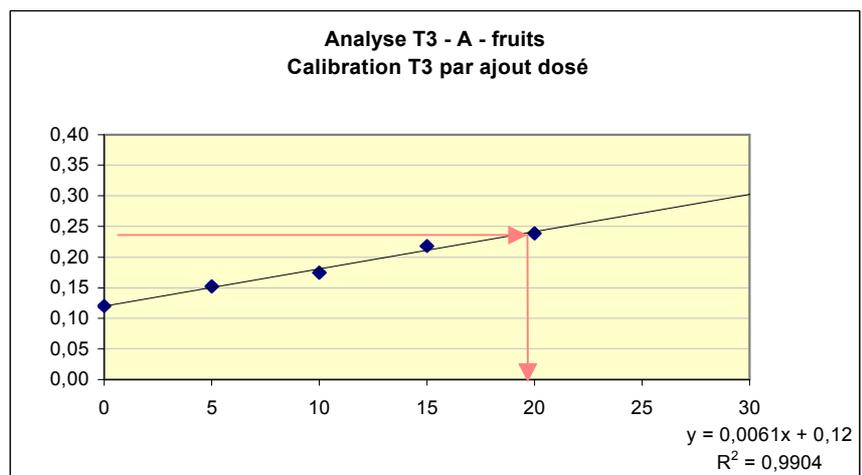
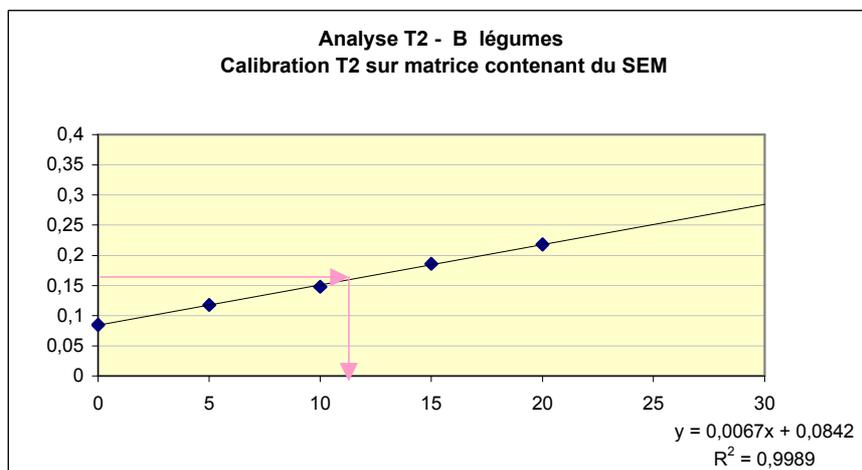
A - Analyses réalisées en calibration sur 2 matrices exemptes de SEM (légumes et fruits)

Ech. T2 - légumes B	a	-0,003	Ech. T3 - fruits A	a	-0,0016
contient du SEM à 10,5 µg/Kg	b	0,008	contient du SEM à 19,1 µg/Kg	b	0,00638



B - Analyses réalisées en calibration sur 2 matrices contenant du SEM (pots pour bébés de légumes et de fruits)

Ech. T2 - légumes B	a	0,084	Ech. T3- fruits A	a	0,120
contient du SEM à 12,6 µg/Kg	b	0,01	contient du SEM à 19,7 µg/Kg	b	0,006



les résultats de cette seconde série d'analyses montrent que :

1. l'analyse des métabolites de nitrofuranes notamment du SEM dans les produits alimentaires transformés pour bébés peut parfaitement être réalisée avec une justesse et une précision suffisante ,
2. les deux matrices testées (fruits et légumes) induisent des différences au niveau du rendement d'extraction du SEM, la matrice fruit semblant moins bien adaptée probablement lié à la présence de sucres en plus grande proportion ;
3. les 2 méthodes par « ajout dosé » (AD) et par calibration sur matrices blanches (exemptes de SEM) (MB) aboutissent toutes deux à des résultats équivalents mais nous préférons par la suite utiliser la méthode avec calibration sur matrice blanche (MB) plus conforme à nos pratiques analytiques courantes.

- **3^e étape : dosages de SEM dans les petits pots pour bébés**

- La troisième étape consiste comme indiqué en introduction à étudier la répétabilité de la présence du SEM dans les petits pots pour bébé et donc à analyser en duplicate les 10 séries de 4 pots (5 de marque A et 5 de marque B soit encore 6 séries de légumes et 4 séries de fruits).
- Les analyses sur pots de fruits seront calibrées par rapport à une gamme de compote de fruit exempte de SEM et les analyses de pots de légumes par rapport à une gamme de jardinière de légume exempte de SEM (conformément aux résultats de la 2^e étape).
- Les séries d'analyse sont répertoriées comme suit :

Séries	Compositions	Agés bébés	Marque	Quantités	Pots	
1	Léaumes 1	4 mois	A	200 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	test Bain marie
2	Léaumes 2	4 mois	A	200 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	test Bain marie
3	Léaumes 3	6 mois	A	200 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	test Bain marie
4	Fruits 4	4 mois	A	130 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	
5	Fruits 5	4 mois	A	130 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	
6	Léaumes 6	4 mois	B	200 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	test Bain marie
7	Léaumes 7	6 mois	B	200 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	test Bain marie
8	Léaumes 8	4 mois	B	200 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	test Bain marie
9	Fruits 9	4 mois	B	130 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	
10	Fruits 10	4 mois	B	130 g	P1	
					P2	
					P3	
					P4	

Pots : 2 prises par pot

Bain marie : 15 minutes à 60°C

- Résultats de l'étude de répétabilité de l'analyse du SEM dans 10 séries de pots pour nourrissons (de marque A et B) :

Série	Type	Masse (g)	Marque	Répétabilité (3 pots x 2 analyses) légumes ou (4 pots x 2 analyses) fruits			Chauffage bain-marie 50°C (1 pot x 2 analyses) légumes		
				Moyenne (µg/Kg)	Ecart-type analytique	CV (%)	Moyenne (µg/Kg)	Ecart-type analytique	CV (%)
1	Légumes 1	200	A	14,56	0,45	3,1	14,01	0,04	0,3
2	Légumes 2	200	A	11,95	1,74	14,6	12,46	0,74	6,0
3	Légumes 3	200	A	7,97	0,80	10,0	8,01	0,26	3,3
4	Fruits 4	130	A	6,55	0,40	6,2	**	**	**
5	Fruits 5	130	A	9,39	1,54	16,4	**	**	**
6	Légumes 6	200	B	11,02	0,62	5,7	11,39	0,11	0,9
7	Légumes 7	200	B	11,26	1,29	11,4	11,32	0,08	0,7
8	Légumes 8	200	B	11,42	0,60	5,2	12,30	0,23	1,9
9	Fruits 9	130	B	7,75	1,05	13,5	**	**	**
10	Fruits 10	130	B	8,09	1,07	13,3	**	**	**

L'écart-type analytique est calculé pour chaque série à partir de l'analyse de plusieurs pots d'une même denrée (d'une même série) analysés 2 fois chacun (4 pots pour les fruits, 3 pots pour les légumes et un pot pour les légumes chauffés au bain-marie).

- Conclusion

Cette troisième série d'analyses montre que :

- Tous les pots analysés contiennent du SEM à des teneurs comprises entre 6 et 15 µg/kg mesurées chaque fois sur l'ensemble du pot ;
- Les pots de fruits contiennent en général moins de SEM que les pots de légumes.

- Conclusion de l'ensemble de l'étude

1. La méthode d'analyse des métabolites de nitrofurannes LMV/03/02 version 1 est tout-à-fait adaptée à l'analyse de semicarbazide dans les petits pots pour nourrissons . Seule une recalibration est nécessaire pour tenir compte des niveaux de contaminations (5 à 20 µg/kg) très supérieurs à ceux recherchés dans les produits alimentaires d'origine animale (< 2 µg/kg).
2. L'étude confirme la présence de semicarbazide (SEM) dans des pots ne contenant par ailleurs aucun produit d'origine animale en quantité majoritaire.
3. Les analyses ont permis de constater une différence appréciable entre les compositions de fruits et celles de légumes mais il n'est pas possible d'en tirer une information plus détaillée quant à la composition végétale des pots. Par contre, la différence pourrait être attribuée au système thermique de stérilisation des pots après fermeture (véritable stérilisation pour les pots de légumes et simple pasteurisation pour les pots de fruits).
4. Quant à l'origine du SEM retrouvé (libre ou lié à des protéines), la méthode d'analyse s'applique sur les résidus totaux de SEM (libres et liés indifférenciables) et ne permet donc pas de faire la différence entre les 2 types de composés.
5. Enfin, l'analyse plus précise de 2 pots (1 à base de légumes et 1 à base de fruits) a permis de constater un gradient de concentration décroissant du haut du pot vers le bas du pot. Ceci conforterait l'hypothèse d'une diffusion du SEM depuis le couvercle lors de la production (étape de pasteurisation ou de stérilisation). L'agent gonflant du joint de couvercle (azodicarboamide) serait alors bien l'agent principal responsable de la production de SEM.

AFSSA

le 18 novembre 2003

ANNEXE 3 : DONNEES DE CONTAMINATION FRANÇAISE (DGCCRF BORDEAUX)

Recherche de semicarbazide dans les aliments : extrait de la note de la DGCCRF à la DG SANCO et en copie à l'Afssa (8 mars 2004)

1- Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués sur des aliments pour bébés (petits pots et jus de fruits), et certains autres produits conditionnés en conserve de verre (jus de fruits, moutarde, mayonnaise, et cornichon) au stade de la fabrication. Les enquêteurs ont recueilli les informations disponibles sur les conditions de fabrication, et notamment sur les barèmes de stérilisation utilisés.

32 prélèvements de trois unités ont été effectués dans les différentes usines de fabrication. Le contenu de trois unités a été mélangé et homogénéisé, et a donné lieu à une analyse.

Des conditionnements vides ont également été prélevés (12 échantillons) afin que des tests de migration puissent être conduits.

2- Analyses

Le dosage du semicarbazide a été fait par LC-MS Tandem (chromatographie liquide couplé à un spectre de masse) et la préparation des échantillons suivant le mode opératoire « Nestlé research center SOP N° 7002 », adapté aux possibilités de mise en œuvre du laboratoire de la DGCCRF de Bordeaux. Avant la mise en œuvre de ces analyses, une inter-comparaison a été réalisée avec le laboratoire de Fougères sur des produits de même nature.

Au total, 44 échantillons ont été analysés, répartis en 32 échantillons de type alimentaire (dosage du semicarbazide) et 12 échantillons de pots et couvercles (migration du semicarbazide).

Chaque série d'analyse a fait l'objet d'une vérification soit par la technique des ajouts dosés, soit par le dosage d'un échantillon de référence.

Les derniers essais de migrations ont été effectués à 100 °C pendant une heure de trois semaines à température ambiante (contrairement aux premiers essais : 100 °C pendant une heure et quatre jours à température ambiante), ce qui a permis d'obtenir une meilleure reproductibilité des analyses. Cependant, les teneurs retrouvées sont du même ordre de grandeur et restent faibles : la valeur maximale retrouvée est de 6 µg/kg de simulants (simulant utilisé : acide acétique à 3 %).

3- Résultats

L'ensemble des résultats obtenus sur les échantillons est rassemblé dans le tableau en annexe.

Le taux de semicarbazide retrouvé dans les échantillons alimentaires varie de < 5 µg/kg à 36 µg/kg. D'une manière générale, ce sont les petits pots « légumes + viande (ou poisson) » qui présentent les teneurs les plus élevées. Les concentrations retrouvées sont relativement homogènes selon le type d'aliment :

- teneur supérieure à 20 µg/kg pour les petits pots de type légumes + viande (ou poisson)
- teneur inférieure à 10 µg/kg pour les petits pots de fruits
- teneur inférieure à 10 µg/kg pour les jus de fruits
- teneur inférieure à 10 µg/kg pour les aliments de type autre que petits pots pour bébé
- Et teneur comprise entre 10 et 25 µg/kg pour les petits pots de légumes.

Un parallèle peut être fait entre le barème de stérilisation et la teneur en semicarbazide retrouvée. Plus le barème de stérilisation est poussé (cas des petits pots contenant de la viande ou du poisson) plus la teneur en semicarbazide est importante.

Les quantités plus faibles retrouvées dans les jus et dans les aliments de type « autre » s'expliquent d'une part par un barème de stérilisation plus « doux » et d'autre part par un volume de produit plus important (effet de dilution).

Annexe - Résultats des analyses

Tableau 1 : quantité de semicarbazide retrouvé dans les échantillons de produits alimentaires

Dénomination	Résultat (µg/kg d'aliments)
Courgette	11
Carotte	22
Pomme/Poire/Miel	<5
Pomme/Fraise	<5
Carotte/Jambon/Riz	27
Jardinière de maïs/Poulet	26
Jardinière de légume/Cabillaud	19
Moutarde	<5
Cornichons	<5
Moutarde	<5
Mayonnaise	<5
Petits pois/Agneau	23
Légumes/Porc	21
Légumes/Poulet/Vermicelle	10
Légumes/Cabillaud	36
Crème lait/Chocolat	20
Pommes/Poires	10
Légumes/Saumon	19
Légumes	12
Haricots verts	29
Jus Pommes/Raisins	6
Courgette	16
Petits pois/Canard	24
Pomme	<5
Pêche/Fraise	<5
Carotte/Jambon	21
Pomme/Banane/Myrtilles	12
Jus de Pommes	<5
Jus carottes/Oranges	11
Jus de carottes	7
Mayonnaise	8
Mayonnaise	11

Tableau 2 : migration du semicarbazide dans les échantillons de pots et de couvercle

Dénomination	Résultat (µg/kg d'aliments)
Pots et Capsules	3
Pots et Capsules	3
Pots et Capsules	0,4
Pots et Capsules	0,9
Pots	4
Couvercles	6
Pots et Capsules	0,6
Pots et Capsules	3,2
Pots	
Capsules	4,4
Couvercles	1,6
Bouteilles	
Couvercles pour bouteille de verre	0,6
Pots	1,3

**ANNEXE 4 : REVIEW 5/10/04 OF BACKGROUND NOTE
SANDERS P
CRL, AFSSA FOUGÈRES**

SUBJECT: SEMICARBAZIDE (SEM): EXPLANATIONS CONCERNING THE ORIGINS OF SEM IN VARIOUS FOODS

The explanations below have either been verified or are a working hypothesis.

1. SEM in products of animal origin is related to nitrofurazone use

It is scientifically proven that SEM - a metabolite of nitrofurazone, a substance prohibited for use in food producing animals- may be detected in animal tissues when nitrofurazone is administered to animals. SEM is used as the marker residue for nitrofurazone and an MRPL of 1 µg/kg has been established.

SEM in products of animal origin is related to semicarbazide exposure.

SEM can be detected as bound residue after oral administration of semicarbazide to live animals (Bock & Gowik, 2004). After oral administration of semicarbazide (6330 µg/kg bw/day) to turkeys during 9 or 16 days, semicarbazide is present in tissue in a total concentration of 790 to 1000 µg/kg with 8 to 15 % of bound residues. The semicarbazide concentration in feed to obtain a certain semicarbazide level of bound residues has not been studied and it is risky to extrapolate for the few data available.

Based on current knowledge, the detection of SEM in pure, unprocessed foods of animal origin could be attributed to the illegal administration of nitrofurazone to the live animals or to a (direct) semicarbazide exposure.

It was not demonstrated that concentration of semicarbazide in feed distributed to animals could reach this level, but it is not excluded that other feed components could be contaminated to a sufficient level (see 3).

2. SEM is a migrant from food contact materials

SEM has been detected at a level of 20 µg/kg in baby foods in glass jars closed with a metal lid with a plastic gasket containing the blowing agent azodicarbonamide (AZDC), a possible precursor of SEM (EFSA, 2003). Moreover, SEM was found in other foods and in the gaskets themselves. Therefore it is possible that SEM itself migrates into foodstuffs or that AZDC is released into foodstuffs where it degrades to SEM.

In baby foods, a gradient decreasing concentration from the top to the bottom was demonstrated in baby foods with vegetables and fruits (AFSSA).

3. SEM is formed from AZDC during food processing

In certain third countries, AZDC is authorised as a flour treatment agent (for bleaching). It has been proven (van Rhijn et al., 2003, Pereira et al, 2004, Becalski et al, 2004) that SEM might be formed from AZDC used in flour, either in the flour itself or during analysis. For example, this may explain findings of SEM in breadcrumbs.

It was demonstrated that semicarbazide is formed during the dry heating of commercial, azodicarbonamide-containing flours at temperatures of 150-200°C, reaching levels of 0.2 mg/kg. Analysis of three sub-samples of bread made with treated flour - a cross section slice, the top crust, and the bread interior - indicated there was 9.8 ng/g semicarbazide in the centre, 28 ng/g in the slice and 106 ng/g in the crust (Becalski et al, 2004).

4. SEM is a migrant from other foods in contact with animal product.

According to the analysis of total nitrofurantol metabolite residues, SEM concentrations range from 27 to 487 µg/kg in various ingredients (pepper, carrageenan, golden bread, breadcrumbs, bread) of Thai origin. The data analysis suggested that semicarbazide was not a natural constituent of either flour or bread but had been introduced during processing (Pereira et al, 2004). A series of experiments was performed which proved that azodicarbonamide and its degradation product, biurea, could break down to yield semicarbazide in a yield of 0.1 % under laboratory conditions (acid hydrolysis) (Kennedy et al, 2004). The concentration of AZDC (Maximal limit : 40 mg/kg) used in the Brazilian cereal industry can provide for SEM in flour covered chicken at concentrations between 0.2 and 5 µg/kg (Pereira et al, 2004). The paper of Pereira et al. considers only total SEM, no differentiation between free and non-extractable SEM is made.

5. SEM is found in carrageenan

SEM has been found in some egg products (e.g. lysozyme) that are obtained by a process involving chromatography on a carrageenan resin column. The in-going egg material was checked under worst case conditions (concentration by lyophilisation) and was negative. The producers of the resin have confirmed the presence of SEM in carrageenan produced from seaweed from 4 out of 5 geographical origins (from 2 ppb to 6 ppb) (Hoenicke et al, 2004).

6. SEM could be obtained after chemical exposure of biological products

A significant formation of SEM was observed after bleaching of semi-refined carrageenan by addition of sodium hypochlorite solution 0,05 – 0,1 % active chlorine (Hoenicke et al , 2004). After exposure for one night with different hypochlorite concentration (0.015 % (disinfection), 0.05 % (bleaching), 1 % and 12 % of active chlorine), a minor formation was observed for egg –white powder, carrageenan and starch with the two lowest concentrations but no SEM formation was detected with shrimps, milk, soybean flakes and red seaweed. SEM formation was detected in the same matrices exposed one night to experimentally very high hypochlorite concentration (1% and 12 % of active chlorine) without relation with the normal use of hypochlorite in food industry. Then, it was concluded that total SEM concentration increased with the growing hypochlorite concentration. This formation does not occur with glucose which does not contain any nitrogen but was demonstrated with creatine, arginine, urea and, creatinine (Hoenicke et al, 2004) with a high conversion rate observed with creatine treated with a small level of active chlorine (0.015 %). SEM could appear after heat treatment (70- 80°C) of egg white powder, egg powder, wheat powder or carrageenan (Gatermann et al, 2004).

The effect of two disinfection processes, the use of sodium hypochlorite in alkaline conditions or respectively the use of peracetic acid on egg-white freeze-dried and lysozyme was investigated (Baiwir et al, 2004). Both treatments are tested on egg white freeze-dried and lysozyme free of semicarbazide. When using KOH 0.1N 0.4 % or 0.8 % NaClO, a high SEM formation was obtained. SEM concentrations ranging between 1-10 µg/kg were obtained after lysozyme was treated with KOH 0.1 N or egg white freeze-dried with 0.2 % or 1 % peracetic acid . The SEM concentration was measured as bound residues (Baiwir, personal communication).

7. SEM is formed from AZDC during the analytical procedure

AZDC is reported to degrade to biurea very quickly. Considering the close resemblance of the molecular structure of biurea to SEM, the latter could be formed during the analytical procedure (acid treatment) (Van Rhijn et al, 2003).

8. SEM (formed from AZDC as well as the original substance) can lead to bound residues in tissues it gets into contact with (Bock & Gowik, 2004).

A pre-experiment revealed that the acid derivatisation step leads to the formation of 11 – 13 % semicarbazide from AZDC in solution. Azodicarbonamide and SEM were spiked into cooked and fresh turkey muscle with an incubation time of 6 hours and 5 minutes respectively. The formation of bound residues was analysed according to the Foodbrand method (Van Rhijn & Mulder, 2002). Semicarbazide was detected in all samples spiked with AZDC or SEM. The percentage of bound residues found (1-18%) seems to depend on the time of incubation. (Bock & Gowik, 2004).

9. SEM is related to the use of some pesticides

It has been suggested that the pesticide triazophos might be a precursor of SEM. This hypothesis was experimentally checked (van Rhijn and Kennedy) and proven false.

10. SEM is a natural constituent of feed and food

Semicarbazide was detected as a naturally occurring constituent in algal or animal products, analysed as dried products (Hoenicke et al, 2004). The concentration in the dry mass of black seaweed dried by lyophilization, in prawns, north sea shrimps, egg and milk powder was below 2 µg/kg of total residue. Based on a five- or ten- fold reduction of the mass, the concentration should be close to the lowest detection capability limits of the LC/MSMS method. It is concluded that the physico-chemical conditions of drying could also be a source of semicarbazide formation.

Discussion

Semicarbazide is a metabolite of nitrofurazone and is present as bound residue in tissue of treated animals. Semicarbazide, as bound residue, is also present after oral administration of semicarbazide to animals. According to our knowledge, no other source of contamination of living animals has been demonstrated so far.

It was demonstrated experimentally that semicarbazide can appear after different food-processing procedures. Semicarbazide is a by-product of the azodicarbonamide use in flour or plastic. Semicarbazide should be a neo-product in certain foods after heat treatment and oxidation processes in relation with disinfection processes.

It was demonstrated that free semicarbazide is removed by the clean-up procedure proposed last year (AFFSA, 2003) for the analysis of processed food but the efficiency of this step seems to vary inter-laboratory on the basis of the latest FAPAS proficiency test (Van Rhijn, Personal communication).

The ratio of semicarbazide bound residue is variable with results ranged between 20-30 % (Van Rhijn, Personal communication) to 50 – 60 % (Bock & Gowik, 2004) after animal treatment with nitrofurazone. However, this ratio varies between samples and the range is unknown for the different types of animal products. The data available were obtained with pigs. Studies with chicken (Kennedy) and turkeys (Bock & Gowik) are ongoing. Data for shrimps or prawns are not described.

It was demonstrated that semicarbazide itself, or as by-product of azodicarbonamide, can react with macromolecules and produce bound residues. Experimentally, after direct contact, low proportions of bound residues were obtained. The ratio of bound/total residues could be expected to be between 10 to 15 %. The proportion of semicarbazide bound residues seems to be lower when it results from a contamination by AZDC-treated flour, a contact with plastic treated with AZDC or when it results from industrial processing. Unfortunately, the large range of food types and industrial processing procedures does not allow us to obtain a reference value for the ratio of bound residues to total residues. It cannot be excluded that higher ratios than so far demonstrated could exist. Moreover, the effects of storage conditions are unknown.

The sample preparation step and the clean-up procedure need to be adapted to each type of processed food, with scientific focus on certain types of food like milk or egg- powder.

The presence of the extraction step, and the application of the method improves the selectivity of the method to analyse bound residue of SEM but taking into account the large range of type of processed food, we cannot evaluate every time the applicability of the confirmatory method for bound residues which was validated for the analysis of semicarbazide in a limited number of raw fresh animal products.

After review of the existing data, the presence of semicarbazide as bound residues in the animal-derived fraction of processed food is not considered as a specific indicator for a nitrofurazone abuse. Indirect contamination or neo-formation are possible and were observed (during the last 12 months) in different types of food-production processes.

Even though it was found that the proportion of bound residues is much higher after a treatment of the animals with nitrofurazone than after a contamination, the data on the ratio of bound to total residues is too scarce to discriminate with the help of this parameter between a nitrofurazone treatment and a contamination with sufficient certainty.

After review of the existing data, the presence of semicarbazide as bound residue in raw animal products is not logically considered as a specific indicator of a nitrofurazone abuse, because an exposure of live animals to semicarbazide leads to the formation of bound residues of semicarbazide. But it was not yet proven that exposure to feed sufficiently contaminated by SEM can occur even if it was demonstrated that in bread made with AZDC containing flour and that poultry feed could be obtained after thermal treatment. This hypothesis has to be confirmed during the research of the origin of a nitrofurazone abuse following a non compliant result on raw product to prove the existence of a cross contamination of animals by SEM which can explain the “non compliant” result.

The presence of semicarbazide has to be reported to food producers for review of their food processing procedures to identify the semicarbazide source. According to Directive 96/23, the control of residues has to be performed on raw products and in live animals with investigation at farm level to prove an application of nitrofurazone.

Considering the different risks:

- toxicological risk for the consumer related to semicarbazide,
- risk for the risk manager that an indirect contamination by semicarbazide exists at different steps of the food processing procedure,
- risk for the risk manager of a nitrofurazone abuse in animals,

The risk management options should be chosen to encourage the development of a safe food production in exporting countries (see report of Joint FAO/WHO technical workshop on residues of substances without ADI/MRL in food, 2004) and follow the commercial rules about food trade.

Conclusion

Processed food

The CRL recommends to measure SEM as bound residue after remove of coating from raw product. The CRL considers that the analytical method is specific about the measurement of semicarbazide in animal products, but a positive result can not considered as “non compliant” according to Directive 96/23 and Regulation 2377/90. The CRL will recommend to the NRLs to review their contracts for the analysis of residues in processed food and invite them to add a comment to their reports stating the presence of bound semicarbazide in animal tissues obtained from processed food about the other possible sources of contamination by semicarbazide and to warn the customer of the dangers of inappropriate action in the case of finding either total or bound SEM residues.

Raw product

The CRL recommends to measure SEM as bound residue in raw product. The CRL considers that the analytical method is specific about the measurement of semicarbazide in animal products, and a positive result can be considered as “non compliant” according to Directive 96/23 and Regulation 2377/90⁹.

⁹ This advice has been established after discussion of the FoodBrand project.

A juridical advice by the commission is recommended for analysis of raw product for bound residue of nitrofurans because the hypothesis that another source of SEM, SEM itself¹⁰, was demonstrated experimentally but was not demonstrated as a realistic source on the field, creating a source of dispute.

References

- AFSSA Concentrations en semicarbazide dans les pots pour bébé. 2003 Rapport interne.
- Bauwir D, Widart J, Eppe G, Lignian J, De Meester F, Maghuin-Rogister G, de Pauw E. Are non-compliant levels of SEM in food always related to the use of nitrofurazone. Euroresidue 2004
- Becalski A, Lau BPY, Lewis D, Seaman SW. Semicarbazide formation in azodicarbonamide-treated flour : a model study. J. Agr. Food Chem. 2004, 52, 5730-5734
- Bock C, Gowik P . Semicarbazide – Nothing but a nitrofurazone residue ? Euroresidue 2004
- EFSA, Advice of the ad hoc expert group set up to advise the European Food Safety Authority (EFSA) on the possible occurrence of semicarbazide in packaged foods, July 2003
- 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 Additives and Contaminants 2004, 21, 526-537
- Kennedy DG, Van Rhijn JA, Kanarat S. Azodicarbonamide, a flour treatment agent, produces semicarbazide residues in bread. Euroresidue 2004.
- Kennedy DG, Van Rhijn JA, McCracken RJ Accumulation of nitrofurans metabolites in poultry meat following exposure of broilers to very low doses of nitrofurans in their diet. 1st International Symposium on recent advances in food analysis. 2003
- Pereira AS, Donato JL, De Nucci G. Implications of the use of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone contamination in coated product. Food Additives and Contaminants, 2004, 21, 63-69
- Van Rhijn JA, Kennedy DG, Mulder P, Elbers IJW, Zuidemma T, Young PB. Is semicarbazide an unambiguous marker residue for nitrofurazone ? 1st International Symposium on recent advances in food analysis. 2003
- Van Rhijn JA, Mulder PPJ, RIKILT. Muscle of poultry, rabbit and aquaculture products – Detection, identification and quantification of furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin and nitrofurazone metabolites by LC/MSMS. 2002 Meeting on National Experts, 11 April 2002, Brussels

¹⁰ The same phenomenon could exist with the other bound residue AOZ, AMOZ and AHD.