

# Formación e identificación de carbamato de etilo en bebidas alcohólicas y alimentos fermentados

*Ethyl carbamate formation and identification in alcoholic beverages and fermented food*

MARTÍNEZ, A. J. Y BLANCO, I.

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca #804 esq. Carretera Central. San Miguel del Padrón. Apartado Postal 4026 Ciudad de La Habana. Cuba.  
E-mail: icidca@ceniai.inf.cu

## RESUMEN

La formación e identificación del carbamato de etilo ha conducido a numerosos estudios para entender mejor su formación y su posterior identificación y cuantificación. En esta revisión sintetizamos lo que ha sido aportado en la literatura que se ha publicado en este tema en las últimas décadas. Se realiza un especial interés en la formación, los precursores y los métodos analíticos de identificación y cuantificación del carbamato de etilo.

**PALABRAS CLAVES:** Carbamato de etilo, precursores del carbamato de etilo, bebidas alcohólicas.

## ABSTRACT

*The formation and identification of ethyl carbamate have led to numerous studies in order to better understand its formation and its further identification and quantification. In this review the contributions accumulated over the last decades to this field, are summarized. Particular emphasis is placed on ethyl carbamate formation, its precursors and the analytical methods used for its identification and quantification.*

**KEY WORDS:** Ethyl carbamate, ethyl carbamate precursors, distilled spirits.

## INTRODUCCIÓN

El Carbamato de etilo, también conocido como uretano, ha mostrado actividad carcinogénica en animales de laboratorios (Inai et al.1991) y ha sido encontrado a niveles de trazas en una gran parte de las bebidas alcohólicas y alimentos fermentados. Estudios preliminares (Zimmerli et al.1986) en la incidencia y formación del carbamato de etilo han indicado que ciertos precursores potenciales que están involucrados en la biosíntesis de la urea son capaces de a formar carbamato de etilo en soluciones modelo. Estos

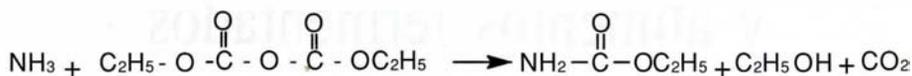
precursores incluyen el fosfato de carbamilo, la citrulina, el beta ureido del ácido propiónico, la alantoína, así como también la urea.

Dada la importancia que tiene el estudio de este compuesto, presentamos en este trabajo una reseña bibliográfica sobre la literatura publicada que se refiere a los mecanismos de formación de carbamato de etilo y a los métodos analíticos utilizados en la identificación y cuantificación del mismo en bebidas alcohólicas y alimentos fermentados de alto consumo a escala mundial.

## INCIDENCIA, PRECURSORES PRINCIPALES Y VIAS POSIBLES DE FORMACION DEL CARBAMATO DE ETILO

La formación del carbamato de etilo en vinos, cervezas y jugos de fruta puede originarse a partir del pirocarbonato de dietilo (DEPC), el cual es usado como aditivo antimicrobiano en

estas bebidas (Thoukis et al. 1962, Gejvall y Lofroth 1971). La reacción del DEPC con amoníaco a pH neutro o alcalino produce carbamato de etilo según la reacción:



El carbamato de etilo se puede formar también, pero en menor proporción, bajo condiciones ácidas donde exista un equilibrio  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  (Joe et al. 1977)

Estudios posteriores (Ough et al. 1976a) indican que el carbamato de etilo está presente de forma natural en bebidas y alimentos fermentados y posteriormente (Ough et al. 1976b) demostró que la adición de DEPC a los vinos causa solamente un ligero incremento en la cantidad de carbamato de etilo por encima de la que se encuentra en ellos de forma natural.

Otros estudios, realizados años más tarde, por este mismo investigador (Ough et al. 1988a) han demostrado que el precursor principal de la formación del carbamato de etilo en vinos es la urea. (Monteiro et al. 1989, Monteiro y Bisson 1991, Ough et al. 1988b, Tegmo-Larsson et al 1989, Tegmo-Larsson y Henick-Kling 1990)

Kodama et al. 1994 han estudiado la contribución de la urea en la formación del carbamato de etilo en vinos comerciales almacenados durante dos años, en estos estudios se ha confirmado que la formación del carbamato de etilo está estrechamente vinculada con el contenido de urea (Stevens y Ough 1993; Tegmo-Larsson y Spittler 1990). Los vinos fueron almacenados a 10°, 20° y 40°C y se determinó el contenido de carbamato de etilo antes y después del almacenamiento.

Estos resultados muestran que la formación de carbamato de etilo está significativamente correlacionada con el contenido inicial de urea en el vino y que este puede reducirse a menos de 2 mg/L antes del período de añejamiento

Posteriormente, se realizó un estudio en el que se trataron vinos con ureasa ácida, con el objetivo de sustituir la urea por este compuesto;

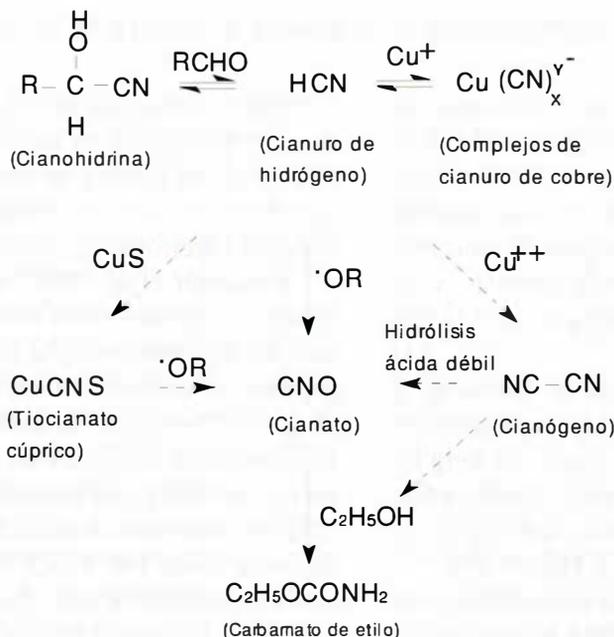
los resultados arrojaron que en los vinos tratados con la ureasa ácida ésta resultó efectiva para prevenir la formación del carbamato de etilo en vinos durante el período de almacenamiento. Sin embargo, estos estudios demostraron que no se puede alcanzar una completa prevención debido a la presencia de otros precursores de la formación de carbamato de etilo, también se confirma que a menor pH y mayor contenido de alcohol etílico se acelera la reacción de formación de carbamato de etilo. (Kodama et al. 1996)

Aylott et al. (1990) estudia la formación de carbamato de etilo post-destilación en whisky de grano. A modo de información general el whisky escocés de grano es el que se produce a partir de la fermentación de diferentes tipos de cereales (normalmente, trigo o maíz).

El whisky fresco destilado contiene concentraciones de carbamato de etilo que no exceden los 2 µg/kg. La formación posterior de carbamato de etilo durante el proceso de añejamiento normal en toneles de roble depende de la presencia en forma de trazas de precursores aniónicos como son: los complejos de cianato, cianuro y cianuro de cobre. Además, se muestra que los precursores del carbamato de etilo se convierten en carbamato de etilo durante los primeros tres meses de maduración y por tanto no se detectan en el producto final embotellado

Esto implica que la concentración final de carbamato de etilo en el destilado depende del nivel inicial de carbamato de etilo medido después de la destilación más el carbamato de etilo formado a partir de los precursores.

Este autor propone el siguiente mecanismo para la formación de carbamato de etilo en whisky escocés.



Otras rutas potenciales de reacción se muestran con flechas discontinuas.

En esta figura se muestran otras especies que están potencialmente involucradas en la formación del carbamato de etilo en el whisky de grano como son el tiocianato y el cianógeno. Los experimentos llevados a cabo en este estudio mostraron que se puede formar hasta 5 ppm de carbamato de etilo en un período de 30 días en 40 % v/v de etanol el cual contiene inicialmente 9 ppm de tiocianato de potasio y 55 ppm de diacetilo con exposición a la luz normal del laboratorio. Sin embargo, la formación de carbamato de etilo aumentó según se incrementó la proporción de diacetilo a tiocianato.

El cianógeno ha sido usado para la síntesis de carbamato de etilo con etanol en presencia de un solvente dipolar aprótico y una catálisis ácida (Grenn 1981).

La conversión de las especies de cianuro en carbamato de etilo puede ser acelerada por inducción de la luz y también por la interacción con la madera en la oscuridad. Por lo que aparentan ser dos mecanismos diferentes los que están involucrados en la conversión de estas especies en carbamato de etilo: una basada en la inducción de la luz y otra basada en los componentes

extraídos del roble. En estos mecanismos se supone que la conversión de cianuro a cianato es por la acción de peróxidos (Baumann y Zimmerli 1987).

Ingledew et al. 1987 llevaron a cabo experimentos donde demostraron que la fermentación de la levadura por sí sola no produce carbamato de etilo en límites detectables (límites de detección de 20 ppb de carbamato de etilo), pero cuando posteriormente se le aplicó calor a las bebidas fermentadas en las cuales la urea está presente se observó la formación de carbamato de etilo en cantidades significativas.

Se han estudiado también los niveles de carbamato de etilo en alimentos fermentados (Canas et al.1989) tales como bebidas de malta, pan, salsa de soya, yogurt, queso y sidra. Estos productos fueron seleccionados por su alto volumen de consumo. Los niveles de carbamato de etilo encontrados en ellos se encuentran en el rango de no encontrado a 3 ppb para los quesos, té, yogurt y sidra; de no encontrado a 13 mg/kg en pan y bebidas de malta y finalmente desde no encontrado a 84 mg/kg en salsa de soya.

Estos estudios han permitido estimar la contribución de carbamato de etilo que estos alimentos y bebidas fermentadas aportan a la dieta americana en este caso.

## MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Dada la carcinogenicidad del carbamato de etilo (Mirvish 1968; Nettleship et al. 1943; Cabanis et al 1996; Stoewsand et al. 1996; Wiley & Sons publ. 1999) es evidente la necesidad de su determinación en productos para el consumo humano, incluidas las bebidas alcohólicas, y de esta manera asegurar que contengan niveles mínimos de esta sustancia.

En Canadá, el Departamento de Bienestar y Salud ha implementado unas guías limitando los niveles de carbamato de etilo hasta 30 ng/g en vinos de mesa, 100 ng/g en vinos fortificados, 150 ng/g en bebidas destiladas y 400 ng/g en brandys y licores (Conacher y Page 1986).

Diversos investigadores han desarrollado numerosos métodos cromatográficos para la determinación de carbamato de etilo. Conjuntamente se han utilizado diferentes detectores para la detección y cuantificación de carbamato de etilo como por ejemplo la utilización de una técnica de dilución radioisotópica (Lofroth y Gejwall 1971. Posteriormente (Walter et al.1974) desarrollaron un método cuantitativo en el cual se realiza una extracción con cloroformo y seguidamente se pasa el extracto por una columna rellena con Florisil y se realiza la determinación cromatográfica en una columna empacada con Gas Chrom Q impregnada con 10% de OV-17 y 5% de Carbowax 1540. Las temperaturas de inyector y la columna fueron de 140 y 200°C respectivamente y la detección se realizó con un detector de conductividad electrolítica Coulson, este método fue capaz de detectar niveles de carbamato de etilo inferiores a 100 ppb. El límite de detección de 5 ng. En cuanto a la identificación del carbamato de etilo en este caso se llevó a cabo realizando la síntesis de un derivado trifluoroacético (TFA) el cual fue detectado por cromatografía de gases usando un detector de llama alcalina. También se compararon los espectros de masas del estándar de carbamato de etilo y del derivado TFA-Carbamato de Etilo.

En los trabajos de Joe et al. 1977 se emplea como fase estacionaria en la columna empaquetada, 10% de etilenglicol adipato sobre Chromosorb W(AW)de 80-100 mesh y la detección se realiza con un detector de ionización de llama o de ionización de llama alcalina. El límite de detección que se reporta es de 20 ng de carbamato de etilo.

Para la confirmación de la identidad de carbamato de etilo en la muestra se acopló el cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas (GC/MS) el cual fue operado en los modos de impacto electrónico e ionización química.

Conacher et al. 1987 reseña el uso del detector de conductividad electrolítica de Hall y el uso de la cromatografía gaseosa con columna capilar. La columna usada fue una DBWAX de 30m x 0.32mm d.i.; la determinación se realizó utilizando un programa de temperatura del horno que se inicia con una temperatura de 50°C, la cual se mantiene durante dos minutos, después aumenta hasta 140°C a 2°C/min. y se mantiene esta temperatura 10 min., Nuevamente se aumenta a 20°C/min. hasta 250°C y se mantiene 10 min. a esta temperatura.

Para la confirmación de la presencia de carbamato de etilo en la muestra se usó la detección por un espectrómetro de masas en el modo de impacto electrónico. Los límites de detección alcanzados por el detector de Hall fueron de 5 µg/kg y de 0.5 µg/kg para detección por espectrometría de masas.

Aylott et al. 1987 han descrito tres métodos de preparación de muestras según la fuente de la muestra y condicionado a la sensibilidad de la detección cromatográfica empleada.

El primer método que se describe, se utiliza cuando la detección se realiza con el detector específico para nitrógeno o con la detección por espectrometría de masas; el segundo método es para detección por espectrometría de masas y el tercero para muestras con mayor grado alcohólico que serán detectadas por espectrometría de masas.

En ese procedimiento se utilizó el carbamato de propilo como estándar interno, este no se detecta en la matriz de la muestra y eluye a un tiempo de detección en el cual se encuentra libre de la interferencia de otros componentes.

Para la detección selectiva de masas se escogió el pico con m/z 62 dada su mayor abundancia relativa y su buena relación señal/ruido. En estas determinaciones se siguen usando las columnas capilares con fase estacionaria polar. El límite de detección de este método es inferior a 5 µg/kg.

Dennis et al. 1986 desarrollaron un método para determinación de carbamato de etilo usando como detector el analizador de energía térmi-

ca en el modo nitrógeno (N/TEA) y lo comparan con el detector electrolítico de Hall concluyendo que en los análisis de rutina el procedimiento por GC-N/TEA provee resultados confiables y logra límites de detección inferiores al del detector electrolítico de Hall.

Canas et al. 1988 reportan un método simple y rápido para la determinación de carbamato de etilo utilizando GC-N/TEA. En este caso se realiza una extracción previa de la muestra por cromatografía de columna usando alúmina desactivada y Celite 545, se utiliza como eluyente el cloruro de metileno y para bebidas que contengan  $\leq 20\%$  de alcohol se añade además una pequeña cantidad de acetato de etilo. Los límites de detección y cuantificación alcanzados por este método son de 1.5 y 3 ppb respectivamente.

Otra forma de confirmar la presencia de carbamato de etilo es el análisis combinado cromatografía gaseosa / espectrometría de masas / espectrometría de masas (GC/MS/MS) esta técnica (Brumley et al. 1988) consiste en adicionar una cantidad conocida de carbamato de etilo marcado con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  al extracto final o a la porción de prueba antes de la extracción. La cantidad de carbamato de etilo marcado debe ser similar al nivel de carbamato de etilo esperado o al que fue previamente hallado por GC-N/TEA. Seguidamente usando la ionización química con isobutano que produce el ión  $(\text{M}+\text{H})^+$  para el Carbamato de etilo y para el carbamato de etilo marcado que también se utiliza como estándar interno. La detección por iones múltiples da como resultado los iones  $m/z$  90, 62 y 44 para el Carbamato de etilo y  $m/z$  92, 64 y 46 para el carbamato de etilo marcado. Para la cuantificación de carbamato de etilo se usa la proporción del ión fragmento 62 para carbamato de etilo y 64 para el carbamato de etilo marcado. Es necesario que para confirmar la identidad del carbamato de etilo los 3 iones se presenten con las intensidades en la proporción correcta.

Dennis et al. 1990 describe un diseño para estudios de cooperación entre 7 laboratorios en los cuales se determinó carbamato de etilo en muestra de whisky y cerveza. Todos los laboratorios usando la cromatografía gaseosa capilar con fase estacionaria polar (polietilenglicol), la mayoría de los laboratorios usó estándar interno y la detección por espectrometría de masa. Los resultados obtuvieron buena repetibilidad y reproducibilidad.

Posteriormente (Dyer 1994) también realizó estudios de colaboración entre 5 laboratorios, en este caso con muestras de bebidas destiladas como el whisky, brandy, ginebra, ron y vodka, los cuales por su contenido bajo en sólidos fueron inyectados directamente al cromatógrafo sin extracción previa. Sin embargo, los licores, los vinos, las cervezas y el sake y otras muestras similares que contienen una cantidad significativa de sólidos requieren una extracción previa antes de la inyección. Las determinaciones se realizaron GC-N/TEA operada en el modo nitrógeno con columna capilar. En este además se reportan estudio de repetibilidad y reproducibilidad.

Otro trabajo, realizado (Canas et al. 1994) nos presenta la determinación de carbamato de etilo en bebidas alcohólicas y en salsa de soya por cromatografía gaseosa con detección selectiva de masas (GC/MSD). En este estudio realizado en 17 laboratorios se han aplicado las siguientes técnicas.

1. Columnas de extracción en fase sólida las cuales han sido usadas para la extracción de líquidos con cloruro de metileno.
2. La detección selectiva de masas la cual ha comenzado a estar recientemente más disponible debido a su costo reducido, siendo ahora de esta manera el sistema de detección a elegir para la cuantificación y la confirmación de la identidad de carbamato de etilo. Los iones que aparecen a  $m/z$  89, 74 y 62 son usados para la confirmación de la presencia de carbamato de etilo.
3. El carbamato de *n*-propilo es usado como estándar interno el cual nos provee de resultados confiables y altamente reproducibles.

La mayoría de los colaboradores usaron columna de sílica fundida del tipo DB-WAX de 30m x 0.25mm d.i y 0.25mm de espesor de película. Otros analistas del mismo estudio prefirieron debido a su baja volatilidad el uso de acetato de etilo como solvente para el extracto final.

Finalmente se recomienda, debido a los resultados reproducibles obtenidos en este estudio, que el método GC/MSD para la determinación de carbamato de etilo en bebidas alcohólicas y salsa de soya, sea adoptado como método por la AOAC INTERNATIONAL (Canas et al. 1994).

La cromatografía de gases multidimensional ha sido también empleada por (Yaping et al. 1996). Las muestras fueron analizadas usando como precolumna una columna capilar PEG-20M y como

columna principal una columna capilar OV-1. La detección se realiza por espectrometría de masas utilizando dilución isotópica y el método de ionización química. La mayor intensidad de los picos de los iones protonizados del carbamato de etilo se reportó a  $m/z$  90 y del carbamato de etilo marcado con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  a  $m/z$  92. La precisión del método fue de 1.1 % para el licor chino que contiene 357.2mg/Kg de carbamato de etilo.

Se describe un procedimiento analítico por cromatografía de gases capilar (Zhou et al. 1996), en el cual se determina el contenido de carbamato de etilo en 8 tipos de vinos. Las muestras de vino se extraen con cloruro de metileno y se llevan casi a sequedad luego son analizadas en una columna capilar BP 20 (25m x 0.22mm d.i x 0.25 mm). Se selecciona el ión  $m/z$  62 para la cuantificación del compuesto de interés. El método permite determinar carbamato de etilo a

niveles de trazas en diferentes bebidas alcohólicas. Los resultados de los análisis de ocho tipos de vinos estudiados muestran contenidos de carbamato de etilo entre 1.01-1.78 mmol/L.

Estudios realizados en Taiwan (Wang et al. 1997) para determinar el contenido de carbamato de etilo en bebidas alcohólicas destiladas comerciales dan como resultado que de las muestras analizadas, las bebidas no destiladas que contienen arroz como materia prima principal utilizada para la fermentación muestra los mayores niveles de carbamato de etilo (1200 ppb). Sin embargo no se detectó carbamato de etilo en las bebidas donde las uvas se utilizaron como material principal para la fermentación.

Los análisis de las bebidas destiladas mostraron que las fermentadas con trigo, centeno y el whisky escocés tiene un contenido mayor que 150 ppb de carbamato de etilo, por lo que exceden el límite de las regulaciones canadienses.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aylott, R.I., et al.(1987). *J. Inst. Brew.* **93**: 382-386.
- Aylott, R.I.,et al.(1990). *J. Inst. Brew.* **96**: 213-221.
- Baumann, U. & Zimmerli, B. (1987). *Mitteilungen Gebeite. Lebensmitteluntersuchung Hygiene* **78**: 317.
- Brumley, W.C., et al.(1988). *Anal. Chem.* **60**: 975-978.
- Cabanis, J.C (1996) Wine: Health and Food Safety. *Ars Pharm.* **37**: 197-220.
- Canas, B.J., et al. (1988). Rapid gas chromatographic method for determining ethyl carbamate in alcoholic beverages with thermal energy analyzer detection. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **71**: 509-511.
- Canas, B.J., et al.(1989). Ethyl carbamate levels in selected fermented foods and beverages. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **72**: 873-876.
- Canas, B.J., et al. (1994). Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and foods by gas chromatography with mass selective detection: collaborative study. *J. of AOAC International* **77**: 1530-1536.
- Conacher, H.B.S., Page, B.D.(1986). *Proceedings of Euro Food Tox II, Zurich.* 237.
- Conacher, H.B.S., et al. (1987). Capillary column chromatographic determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **70**: 749-751.
- Dennis, M. J., et al. (1986). *J. Chromatogr.* **369**: 193-198.
- Dennis, J.M., et al. (1990). Cooperative trial studies on the analysis of ethyl carbamate using capillary gas chromatography. *J. of High Resolution Chromatogr.* **13**: 247-252.
- Dyer, R.H.(1994). Determination of ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages using capillary gas chromatography with thermal energy analyzer detection: Collaborative study. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **77**: 64-66.
- Gejvall, T., and Lofroth, G.(1971)*Newslett Environ. Mutagen Soc.* **5**:35-36.
- Grenn, J.L.(1981). *U.S. Patent.* 4,301,087.
- Inai, K., et al.(1991). Quantitative risk assessment of carcinogenicity of urethane (ethyl carbamate) on the basis of long-term oral administration to B6C3F1 mice. *J. Cancer Res.***82**: 380-385.
- Ingledeew, W.M., et al.(1987). *Am. J. Enol. Vitic.***38**: 332-335.
- Joe, F.L., et al.(1977).Determination of urethane in wines by gas-liquid chromatography and its confirmation by mass-spectrometry. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **60**: 509-516.
- Kodama, S., et al.(1994). Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage. *Am. J. Enol. Vitic.* **45**: 17-24.
- Kodama, S. et al. (1996) Acid urease: reduction of ethyl carbamate formation in sherry under simulated baking conditions. *J. Food Sci.* **61**: 304-307.
- Lofroth, G., Gejvall, T.(1971). Diethyl pyrocabonate formation of urethane in treated beverages. *Science.* **174**: 1248-1250.
- Mirvish, S.S.(1968). The carcinogenic action and metabolism of urethan and N-hydroxy urethan. *Advan. Cancer Res.* **11**: 1-42.
- Monteiro, F.F., et al. (1989). Ethyl carbamate formation in wine: Use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *Am. J. Enol.Vitic.***40**:1-8.

- Monteiro, F.F., and Bisson, L.F. (1991). Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**: 199-208.
- Nettleship, A., et al. (1943). *J. Natl. Cancer Inst.* **4**: 309-319.
- Ough, C.S., et al.(1976a). Ethyl carbamate in fermented beverages and food. I. Naturally occurring ethyl carbamate. *J. Agric. Food Chem.* **24**: 323-328.
- Ough, C.S., et al.(1976b). Ethyl carbamate in fermented beverages and food. II. Possible formation of ethyl carbamate from diethylidicarbamate addition to wine. *J. Agric. Food Chem.* **24**: 328-331.
- Ough, C.S., et al.(1988a). Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea and ammonia; effect of fortification on inter cellular and extra cellular precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**: 243-249.
- Ough, C.S., et al. (1988b). Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**:239-42.
- Stevens, D.F., and Ough, C.S. (1993). Ethyl carbamate formation: Reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**: 309-12.
- Stoewsand, G.S., et al.(1996). *J. Wine Res.* **7**: 207-211.
- Tegmo-Larsson, I.-M., et al (1989). Effect of malolactic fermentation on ethyl carbamate formation in Chardonnay wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **40**:106-8.
- Tegmo-Larsson, I.-M., and Henick-Kling, T.(1990). The effect of fermentation and extended lees contact on ethyl carbamate formation in New York wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**:269-72.
- Tegmo-Larsson, I.-M., Spittler, T.D.(1990). Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. *J. Food Sci.* **5(4)**:1166-9.
- Thoukis, G., et al.(1962). Fate of diethyl pyrocarbonate in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **13**:105-13.
- Walker, G., et al.(1974). Gas chromatographic analysis of urethane (ethyl carbamate) in wines. *J. Agric. Food Chem.* **22**: 944-951.
- Wang et al.(1997) Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages retailed in Taiwan *Chinese agricultural Chemical Society* **35**: 40-51.
- Wiley, J. & Sons publ. (1999). *Encyclop. Food Sci. & Tech.*, 2<sup>nd</sup> Edition. New York.
- Yaping et al. (1996) Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with multidimensional gas chromatography / isotopic dilution mass spectrometry. *Fenxi Huaxue* **24**: 36-40.
- Zhou et al.(1996) Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by selected ion monitoring in capillary gas chromatography / mass spectrometry. *Sepu* **14**: 190-192.
- Zimmerli, B., et al.(1986). Proceedings of Euro Food Tox II, Zurich ,243.