

# 발효식품의 발암원 Ethyl carbamate 측정

고 은 미

서울대학교 식품영양학과

Ethyl carbamate(urethan[e]: $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ , EC)는 발효과정에 생성되는 부산물로서, 알코올 음료와 발효식품에 함유되어 있는 발암물질로 알려져 있다. 1940년대에 사람의 최면제(1g/day)로, 실험동물의 마취제로 사용되었으나, 동물에 대한 발암성과 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 돌연변이성이 밝혀진(Vogt, 1948) 후, 사람의 치료제로 사용되는 것이 금지되고 실험동물의 마취제로만 이용되고 있다(Zimmerli and Schlatter, 1991).

외국에서는 발효식품에 존재하는 EC에 대한 연구가 진행되고 있는 반면, 한국의 발효식품에 대한 연구가 전무하여, 국내 알코올 음료와 발효식품의 연구의 필요성을 인식하였다. 따라서 지금까지의 연구 문헌을 토대로 EC의 정량법, 식품내 함유량, 생성 경로, 체내에서의 대사경로, 외국의 규제치에 대하여 간략하게 살펴볼 예정이다.

## 1. 정 량 법

EC는 수용성(2g/ml)이면서 지용성이며, 수증기압이 1mmHg(at 30-40°C)으로 식품에 존재하는 미량을 분석할 때 loss가 일어나기 쉽다.

EC 추출 용매는 디클로로메탄, 에틸 아세테이

트, 클로로포름, 에테르, 아세톤 등이 이용되는데 주로 디클로로메탄을 이용한다. 고체상 추출법으로는 알코올 농도를 5% 이하로 희석시킨 wine과 whisky를 Extrelut tube에 흡착시킨 후 디클로로메탄을 이용하여 용출시키기도 하며, 추출물을 florisil에 흡착시킨 후 7% 메탄올/디클로로메탄을 이용하여 용출시키기도 한다(Dennis 등, 1986). Canas 등(1988)은 알코올 음료를 celite와 섞어 칼럼에 충전시킨 후 디클로로메탄으로 용출시키기도 하였다. 그리고 clean-up단계와 병행하여 n-pentane으로 비극성 coextractives를 제거할 수 있다.

EC의 추출 효율은 일반적으로 EC의 농도와 추출 방법에 따라 다르다. 내부 표준물질을 이용하지 않는 경우, EC의 효율은 거의 60% 이상이며, 대부분은 80% 이상이다. 알코올 음료에 대하여 보고되었던 검출 한계 농도는  $\sim 1 \sim 100\text{ng/ml}$  범위이다.

Methyl, n-propyl, n-butyl 그리고 tert-butyl carbamate가 대부분 GC/NPD와 GC/MS의 내부 표준 물질로 이용되었다. 그리고 N, N-dimethyl, N-trifluoroacetyl, N, N-dimethyl aminomethylene ethyl carbamate로 유도체화 시키기도 하였다.

EC를 저장하거나 추출할 때에 가장 고려하여야

할 문제점은 안정성이다. Wine의 경우 urea를 포함하기 때문에 가열하면 EC농도가 증가하며, stone-fruit brandies는 빛에 노출되었을 때 EC농도가 급속도로 증가되지만 가열에 대해서는 별로 영향을 받지 않았다. 또한 EC를 강알칼리에서 추출하면 일부가 파괴된다는 보고도 있다.

검출은 주로 가스 크로마토그래피를 이용하는데 capillary 칼럼(예; 극성액상, polyethylene glycols)을 쓰며, 검출기는 flame ionization detector (FID), thermionic detector(NPD), electrolytic conductivity detector(Hall), thermal energy analyzer(TEA), mass spectrometer(MS, EI-MS, CI-MS, MS-MS, ITD)이 이용되고 있다. FID는 distilled 시료 분석시에 이용되었다. 하지만 wine의 경우 diethyl succinate와 같은 방해 물질이 생길 수 있으므로 부가적인 clean-up(alumina)이 필요하다고 보고하였으며(Pierce 등, 1988), sake의 경우 florisil clean-up을 하였지만 EC 검출시간에 다른 2개의 피크가 나타나므로 N, N-dimethylaminomethyl ethyl carbamate로 유도체화시켜야 한다는 보고(Kobayasi 등, 1987)가 있다. 그리고 Zimmerli and Schlatter(1991)는 FID는 non-distilled 시료에는 부적당하다고 보고하였다. NPD는 Hall, MS 또는 TEA와 같은 다루기 힘들고 값비싼 장비에 비하여 비용이 적게 들고 사용하기 간편하지만, 적절한 추출법이 병행되지 않는다면 distilled spirits 이외의 시료에서는 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 없다고 보고하였다. Hall 또는 NPD를 이용할 때는 마지막 추출물에  $Cl^-$ 을 제거해야 한다(Dennis 등, 1986). MS는 최근에 많은 연구에서 이용되고 있는데, electron impact ionization mode(EI)는  $m/z$  44[ $NH_2CO \cdot$ ] $^+$ , 45[ $C_2H_5O^+$ ] 그리고 62[ $M-C_2H_3 \cdot$ ] $^+$ , 74[ $M-CH_3 \cdot$ ] $^+$  그리고  $m/z$  89[M] $^+$  fragment를 나타내는데,  $m/z$  62가 가장 감도가 좋고 다른 피크와 구별되기 때문에 selected ion monitoring mode(SIM)로  $m/z$  62에서 EC를 정량하였다(Brumoey 등, 1988; Hasegawa 등 1990; Matsudo 등, 1993). 그리고

chemical ionization mode(CI)는 isobutane과 methane이 이용되는데 주로 methane CI가 구조적으로 의미있는 fragment와 분자량에 대한 정보를 주기 때문에 더 많이 선호된다.

## 2. 각 식품에서의 함유량

표 1, 2에 나타난 각 식품에서의 EC 농도를 보면 알코올 음료에서 fruit brandies(plums, apricots, cherries)가 가장 높고, vodka, apple wine, 맥주는 낮았으며, 발효식품의 경우 간장은 높았고 치즈, 요구르트, 차는 미량이었다. 효모로 발효한 식품이 발효시키지 않은 식품보다 EC 함유량이 더 높았으며(Diachenko 등, 1990), 서구 식습관에서 주식인 빵은 구울수록 EC가 3배로 증가한다고 하였다(Canas 등, 1989). 담배도 고농도(310-375ppb)의 EC를 포함하고 있다고 알려져 있다(Schmeltz 등, 1978).

Zimmerli and Schlatter(1991)는 서구의 식생활 패턴에서 성인의 하루 평균 EC섭취량을 체중 kg당 10-20ng이며, 만약 매일 담배를 20개피씩 피울 경우에는 EC 섭취량이 2배로 증가하며, table wine을 200-300ml(10ng/ml)를 마시면 3배로 증가하고, stone-fruit randy을 하루에 30ml씩 마시면 그 섭취량이 60배나 증가한다고 하였다.

Hasegawa등(1990)이 일본의 발효식품에서 EC 양을 측정한 연구에 의하면, miso(14; 시료수를 나타냄)는 n.d.-5ppb, natto(9)는 n.d.-5ppb, moromi(5)는 n.d.-10ppb, mirin(2, a sweet kind of sake used for cooking)은 n.d.-5ppb, sake(9)는 5-100ppb, soy sauce(10)는 <50ppb가 존재하였다.

## 3. 생성 경로

1971년 과일쥬스에 살균제로 이용되는 diethyl dicarbonate( $(CH_3CH_2OCO)_2O$ , DEDC)가 암모니아와 반응하여 EC를 형성한다고 밝혀진(Lofroth & Gejvall, 1971; Ough, 1976a)후 미국에서는

Table 1. EC Levels Found in Selected Alcoholic Beverages (ng/g)

Beverage	Range	Median	References
Stone-fruit brandies (cherry, plum, apricot, etc)	100-20000	2000	Baumann, Zimmerli, 1986 Battaglia <i>et al.</i> , 1990
Sake, rice wine	10-900 <10-116	130	Battaglia <i>et al.</i> , 1990 Hasegawa <i>et al.</i> , 1990
Bourbon whiskies	<30-350	265.5	Diachenko <i>et al.</i> , 1988
Other whiskies	<10-170 19-90	90 40 44	Battaglia <i>et al.</i> , 1990 Battaglia <i>et al.</i> , 1990 Dennis <i>et al.</i> , 1989
Other distilled spirits (e. g., apple, grape) and liqueurs	<10-200	20	Battaglia <i>et al.</i> , 1990
		<30	Battaglia <i>et al.</i> , 1990
	9-439	129	Dennis <i>et al.</i> , 1989
Gin, vodka	<1-10 <5	<1 2.5	Battaglia <i>et al.</i> , 1990 Dennis <i>et al.</i> , 1989
Table wines	10-110	10-15	Battaglia <i>et al.</i> , 1990
Sweet wines (malaga, port, sherry)	10-250	50	Battaglia <i>et al.</i> , 1990
Beer	0.3-18 <1-1.8	1 <sup>a</sup> 0.1-1.1	Battaglia <i>et al.</i> , 1990 Dennis <i>et al.</i> , 1989
Apple wines	<1-3	1 <sup>b</sup>	Canas <i>et al.</i> , 1989

<sup>a</sup> The actual concentration may be less as a result of changes in the production process

<sup>b</sup> Mean

DEDC사용이 금지되었다(Canas 등, 1989). 그러나 yeast 영양분으로 ammonium phosphate 또는 sulfate를 이용하는 스위스의 stone-fruit brandies에서도 EC 농도가 높았으며(Zimmerli and Schlatter, 1991), 일본의 청주에는 DEDC가 존재하지 않았는데 상당량의 EC가 검출된 점을 미루어 볼 때(Ough 등, 1988a)또 다른 인자가 있음을 보여 준다.

EC에 대한 초기 연구에서는 각 식품에서의 EC 농도 측정과 그 유해성에 대한 동물실험을 주로 행하였으나, 점차 각 식품에서 EC를 생성하는 전구체를 밝히기 위하여 에탄올, urea, cyanic acid, 아르기닌, 오르니틴, 시트룰린 등의 전구체의 함량과 EC농도와의 상관관계를 알아보기 위한 연구(Mat-

sudo 등, 1993; Ough 등, 1976, 1988, 1990; Solymosy 등, 1978; Hasegawa 등, 1990; Fauhl 등, 1993)와, 또한 EC 형성에 영향을 주는 저장 조건과 기간, 숙성 온도, 가열에 따른 EC 생성량의 변화에 대한 연구가 보고되었다(Matsudo 등, 1993; Tegmo-Larsson and Spittler, 1988; Ough 등, 1988; Canas 등, 1989; Fauhl 등, 1993).

지금까지 밝혀진 EC의 생성 경로는 다음과 같다.

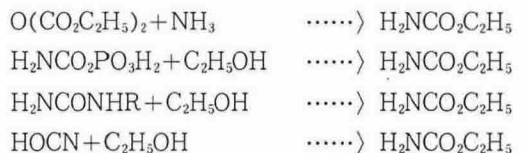


Table 2. EC Levels Found in Non-Alcoholic Foodstuff(ng/g)

Commodity	sample #	Mean	Range	Reference
Bread	10	7	3-15	Zimmerli <i>et al.</i> , 1986
	4	1.3	0.7-1.6	Ough, 1976a
		30 <sup>a</sup>	10-61	Ough, 1976a
	30	1.8	n.d <sup>d</sup> -8	Canas <i>et al.</i> , 1989
	9	<5		Dennis <i>et al.</i> , 1989
Milk, pasteurized	1	0.3		Zimmerli <i>et al.</i> , 1986
Milk, UHT	1	0.3		Zimmerli <i>et al.</i> , 1986
Milk, homogenized	1	0.0		Ough, 1976a
Milk, skimmed	1	2.8		Ough, 1976a
Yoghurt	1	1.0		Ough, 1976a
	1	<0.3		Zimmerli <i>et al.</i> , 1986
	12	n.d.	n.d.-3	Canas <i>et al.</i> , 1989
	9	<1		Dennis <i>et al.</i> , 1989
	15	n.d.	n.d.	Canas <i>et al.</i> , 1989
Cheese	19	<5	<5-6	Dennis <i>et al.</i> , 1989
Apple-vinegar	1	3.3		Zimmerli <i>et al.</i> , 1986
Wine vingar	6	8.8	4-26	Diackento <i>et al.</i> , 1988
Cider	8	n.d.	n.d.-3	Canas <i>et al.</i> , 1989
Olives	1	1.1		Ough, 1976a
Sauerkraut	1	0.3		Zimmerli <i>et al.</i> , 1986
Soy sause	1	4.4		Ough, 1976a
	6	14	n.d.-46	Canas <i>et al.</i> , 1989
	20	7.2	n.d.-35.2 <sup>c</sup>	Matsudo <i>et al.</i> , 1993
	6	6.1	n.d.-14.8 <sup>d</sup>	Matsudo <i>et al.</i> , 1993
Orange juice	1	1.5	1.5	Ough, 1976
Tea	6	n.d.	n.d.	Canas <i>et al.</i> , 1989

<sup>a</sup> Extraction under acidic(1N hydrochloric acid) condition.

<sup>b</sup> n.d., not detected.

<sup>c</sup> Collected from market in Japan

<sup>d</sup> Collected from market in U. S. A

1985년 이후에 EC 형성에 대한 다양한 연구 결과가 보고되었지만 아직도 알코올 음료나 발효식품에서의 생성 경로는 불확실하다. Mackenzie 등(1990)은 scotch whiskey에서 cyanide, copper cyanide, complex anions, lactonitrile, cyanate 등이 전구체라고 보고하였으며, Ough(1986)는 포도주에서 urea, cyanate, 시트룰린, carbamyl phosphate가 에탄올과 반응하여 EC를 생성한다고 보고하였다. 그중 arginase에 의한 아르기닌의 분해

산물인 urea는 주요한 전구체이며, *S. bayanus*가 *S. cerevisiae*보다 적은 양의 EC 전구체를 생성한다고 보고하였다(Ough, 1988b). Wine, sake, bread는 가열 처리한 후에 EC생성량이 크게 증가한다고 보고하였다(Ough 등, 1988a).

간장의 경우 젓산과 아르기닌은 EC형성에 직접적인 영향을 주지 않았으며, urea도 매우 소량(3.5-7.8ppm)함유되어 있어 EC형성에 의미있는 영향을 주지는 않았지만 시트룰린은 EC와 높은 상관

관계( $r=0.933$ )를 보였으며 가열 시간과 EC생성량이 높은 상관관계( $r=0.998$ )를 보였다. 발효시키지 않은 간장과 발효시킨 간장을 각각 10개, 5개 분석하였을 때 발효시킨 간장의 EC함량이 더 높게 나타났다고 하였다(Fauhl 등, 1993).

간장에서 EC형성 경로 중 하나는 보존제로 첨가되는 에탄올로부터 형성된다고 하였는데(Hasegawa 등, 1990), 이와 일치하는 결과로서 간장의 에탄올 농도를 5%로 맞춘 후 40°C, 어두운 곳에 저장하였을 때 EC 생성량이 첨가전보다 증가하였다(Fauhl 등, 1993).

#### 4. 대사 경로

EC는 섭취후 체내에서 vinyl carbamate로 대사된 후 epoxidation을 거쳐 DNA, RNA adduct를 형성하는데, DNA adduct는 돌연변이성을 나타낸다고 믿어진다. 실제로 mouse, rat에 EC를 주입하였을 때 DNA adduct인 7-(2-oxoethyl)-guanine이 형성되었다고 하였다(Miller and Miller 1983).

EC의 주요 target기관은 폐, 간, 유선(Mirvish, 1968; Schmahl et al., 1977)이며, 악성림프종, 피부종양, 간종양, 혈관성 종양 등도 일으키는 "multipotential" 발암물질이다(Mirvish, 1968).

또한 종, 기관, 성장 단계에 따라 그 유해성이 다르다(Mirvish, 1968). 갓 태어난 쥐에게 위관영양으로 체중kg당 100mg EC를 주입하였을 때 80-100%가 폐종양이 발생하였으며, 임신한 쥐에게 출산 전에 EC를 주입하였을 때 새끼 100%가 6개월내에 폐암이 유발되었다고 하였다(Mirvish, 1968). EC를 세 종의 mouse인 A/J, C3H, C57BL에게 체중kg당 100mg EC를 복강에 주사하였을 때 24주후 폐암 발생율이 각각 94%, 6%, 13%라고 보고하였다(Allen 등, 1986). 태어난지 1주일된 5종의 mouse A, C, C3, AC3, CC3에게 체중 kg당 300mg EC를 피하에 한 번 투여한

male은 40주, female은 65주 후에 실험한 결과, 간종양 발생율이 male의 경우 A는 74% C는 40%, C3, AC3, CC3는 모두 100%였으며, female의 경우 A는 25%, C는 22%, C3, AC3, CC3는 모두 100%로 종과 성별에 따라 그 유해성이 다르게 나타났다고 하였다(Dragani 등, 1991).

이와 같은 다양한 종에 대한 여러가지 양성, 악성 종양의 실험 결과로 EC는 인간에게도 발암물질로 작용할 수 있다고 유추할 수 있다.

#### 5. 규 제 치

1972년 Federal Food, Drug and Cosmetic Act는 암모니아와 반응하여 EC를 생성하는 DEDC의 사용을 금지하였다(Canas 등, 1989).

1985년 캐나다 보건기구는 yeast 영양분으로 요소를 첨가하여 발효시키는 포도주와 증류주에 고농도의 EC가 존재한다고 발효한 후 알코올 음료에 첨가하는 요소의 사용을 금지하고, 알코올 음료에 대한 EC농도를 규제하였다. 그 내용은 알코올 함량이 14%이하인 table wines은 EC농도를 30ppb, 알코올 함량이 14% 이상인 dessert wines (port, sherry)는 100ppb, distilled spirits는 150ppb, fruits brandies와 liqueurs는 400ppb, sake는 200ppb이하로 규제하였다(Conacher 등, 1987).

FDA는 1987년 Distilled Spirits Council of the United States(DISCUS)가 1989년 이후에 생산되는 위스키의 EC농도를 125ppb로 감소시키겠다는 자율규제안을 받아들였으며, 1988년 Wine Institute and American Association of Vintners가 제안한 자율규제안을 받아들였다. 그 내용을 보면 1988년 수확치부터는 알코올 농도가 14% 이하인 table wines의 EC농도를 15ppb이하로 낮추고, 1989년 수확치부터는 알코올 농도가 14% 이상인 dessert wines의 EC농도를 60ppb로 낮추며, 1995년 수확치부터는 table wines의 1%만이 EC농도가

25ppb이상 포함할 정도로 감소시키고, dessert wines의 1%만이 90ppb이상을 함유하도록 감소시키겠다고 하였다(Diachenko 등, 1992).

California's Proposition 65는 큰 위험이 없는 (no significant risk) EC의 하루 섭취량을 0.7 $\mu$ g이라고 하였다(Zimmerli and Schlatter, 1991).

Schlatter(1990)는 지금까지 EC에 대한 동물실험을 수집하여 EC의 종과 기관 특이성을 기초로 하여 외삽한 결과 100만명 중 한명만이 종양이 발병될 수 있을 정도의 양, 즉 실질적으로 안전한 (virtually safe dose) 하루 섭취량을 체중kg당 20-80ng이라고 보고 하였다.

## 6. 맺 음 말

EC의 정량법, 생성 경로, 함유량, 대사 경로, 규제치에 대하여 간략하게 살펴보았다. EC생성을 억제하는 방법으로는 요소분해효소(urease)를 이용하여 요소를 줄이는 방법과, 과일 주스에 첨가하는 DEDC의 사용을 금지하거나 EC를 생성하기에 적합한 생화학적 조건을 피하는 방법과, 적절한 발효 효모를 이용하는 방법 등이 연구되고 있지만, 아직 생성 기작이 확실히 밝혀지지 않았으며 경제적 문제 때문에 실용화 단계에 이르지 못하고 있다.

국민영양조사에 의하면 한국인의 하루 섭취량 중 발효식품(김치류, 간장, 된장, 고추장, 젓갈류, 탁주)이 차지하는 비율이 13.7%(87년), 15.1%(90년), 12.8%(91년), 13.8%(92년)이었다(보건사회부, 1987, 90, 91, 92). 지금까지 발효식품의 맛 성분 중 단백질의 분해산물인 아르기닌의 함량과 발효생성물인 에탄올에 대한 보고를 종합하여 보면, 국내의 발효식품에도 EC가 존재할 수 있다고 유추할 수 있다. 따라서 국내에서도 수출입 자율화에 대비하여 수출품에 대한 EC규제를 피하고, 수입품에 대한 EC를 규제하기 위하여 EC에 대한 더 많은 관심과 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 참고문헌

- 보건사회부 (1987, 1990, 1991, 1992). 국민영양조사 보고서.
- Allen, J.W., Stoner, G.D., Pereira, M.A., Backer, L.C., Sharief, Y., Hatch, G.G., Campbell, J.A., Stead, A.G. and Nesnow S. (1986) Tumorigenesis and Genotoxicity of Ethyl Carbamate and Vinyl Carbamate in Rodent Cells. *Cancer Res.* 46 : 4911-4915
- Battaglia, R., Conacher, H.B.S. and Page, D. (1990). Ethyl Carbamate(urethane) in alcoholic beverages and foods : a review, *Food Add. Contam.*, 7 : 477-496
- Brumley, W.C., Canas, B.J., Perfetti, G.A., Mossoba, M.M., Sphon, J.A. and Corneliussen, P.E. (1988). Quantitation of ethyl carbamate in whiskey, sherry, port, and wine by gas chromatography/tandem mass spectrometry using a triple quadrupole mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 60 : 975-978
- Canas, B.J., Harvey, D.C. and Joe Jr., F.L. (1988). Rapid gas chromatography method for determining ethyl carbamate in alcoholic beverages with thermal energy analyzer detection. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 71 : 509-511
- Canas, B.J., Harvey, D.C., Robinson, L.R., Sullivan, M.P., Joe Jr. F.L. and G.W. Diachenko (1989). Ethyl carbamate levels in selected foods and beverages. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* 72 : 873-876
- Conacher, H.B.S., Page, B.D., Lau, B.P.Y., Lawrence, J.F., Bailey, R., Calway, P., Hanchay, J.P. and Mori, B. (1987). Capillary column gas chromatographic deter-

- mination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 70 : 749-751
- Dennis, M. J., Howarth, N., Key, P. E., Pointer, M. and Massey, R.C. (1989). Investigation of ethyl carbamate levels in some fermented foods and alcoholic beverages. *Food Add. Contam.*, 6 : 383-389
- Diachenko, G.W., Canas, B.J., Joe, F.L., and DiNovi, M. (1990). Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages and Fermented Foods. In : Finley, J.W., Robinson, S.F., Armstrong, D.J., *Food Safety Assessment*, pp 419-428
- Dragani, T.A., Manenti, G. and Porta, G.D (1991). Quantitative Analysis of Genetic Susceptibility to Liver and Lung Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res.* 51 : 6299-6303
- Fauhl, C., Catsburg, R. and Wittkowski, R. (1993). Determination of ethyl carbamate in soy sauces. *Food Chemistry.*, 48 : 313-316
- Hasegawa, Y., Nakamura, Y., Tonogai, Y., Terasawa, S., Ito, Y., and Uchiyama, M. (1990). Determination of ethyl carbamate in various fermented foods by selected ion monitoring. *J. Food Prot.*, 53 : 1058-1061
- Lofroth, G. and Gejvall, T. (1971). Diethyl pyrocarbonate : Formation of urethane in treated beverages. *Sciences.* 174 : 1248-1250
- Mackenzie, W.M., Clyne, A.H. and Macdonald, L.S. (1990). Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II. The identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in Scotch grain whisky. *J. Inst. Brew.* 96 : 223-232
- Matsudo, T., Aoki, T., Abe, K., Fukuta, N., Sasaki, M., and Uchida, K. (1993). Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. *J. Agric. Food chem.* 41 : 352-356
- Miller, J.A., and Miller, E. C. (1983). The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally occurring carcinogens : recent results with ethyl carbamate and spice flavors safrole and estragole. *Br. J. Cancer.* 48 : 1-15
- Mirvish, S.S. (1968). The carcinogenic action and metabolism of urethane and N-hydroxyurethane. *Adv. Cancer Res.* 11 : 1-42
- Ough, C.S. (1976a). Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Nationally occurring ethyl carbamate. *J. Agric. Food Chem.* 24 : 323-328
- Ough, C.s. (1976b). Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. II. Possible formation of Ethylcarbamate from diethyl dicarbamate addition to wine. *J. Agric. Food Chem* 24 : 328-331
- Ough, C.S., Crowell, E.A. and Gutlove, B.R. (1988a). Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* 39 : 239-242
- Ough, C.S., Crowell, E.A. and Mooney, L.A. (1988b). Formation of Ethyl carbamate precursors during grape juice(chardonnay)fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia : effects of fortification on intracellular and extracellular precursor. *Am. J. Enol. Vitic.* 39 : 243

-249

- Pierce, W. M., Clark, A.O. and Hurst, H.E. (1988). Determination of ethyl carbamate in distilled alcoholic beverages by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71 : 781-784
- Schmeltz I., Chiong, K.G. and Hoffmann, D. (1978). Formation and determination of ethyl carbamate in tobacco and tobacco smoke. *J. Anal. Toxicol.* 2 : 265-268
- Solymosy, F., Antoni, F. and Fedoresak, I. (1978). On the amounts of urethane formed in diethyl pyrocarbonate treated beverages. *J. Agric. Food Chem.* 26 : 500-503
- Tegmo-Larsson, I-M., and Spittler, T.D. (1990). Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. *J. Food Sci.*, 55 : 1166-1169
- Vogt, M. (1948). Mutationsauslösung bei *Drosophila* durch Aethylurethan. *Experientia.* IV/2, 68
- Zimmerli, B. and Schlatter J. (1991). Ethyl carbamate : analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutation Resarch.* 259 : 325-350
-