

**ESTADO DEL ARTE SOBRE DETERMINACIONES DE
CARBAMATO DE ETILO Y LAS CONCENTRACIONES
LEGISLADAS PARA BEBIDAS FERMENTADAS Y DESTILADAS**

**ART STATE ABOUT CARBAMATE ETHYL DETERMINATIONS AND
CONCENTRATION REGULATED IN THE FERMENTED AND DISTILLED
DRINKS**

Magdalena Lorenzo Izquierdo^{1}, Dacelis Borroto Mato² y Olga Porto Ruz¹*

¹ICIDCA, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, Apartado Postal 4026, Vía Blanca 804, San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana, Cuba.

²Facultad de Química, Universidad de la Habana, Zapata s/n, e/ G y Carlitos Aguirre, Ciudad de La Habana, Cuba, Apartado Postal 10400.

Recibido: Marzo 17, 2014; Revisado: Mayo 14, 2014; Aceptado: Julio 4, 2014

RESUMEN

El carbamato de etilo (CE) de fórmula química $H_2NCOOC_2H_5$ es también denominado uretano, es el éster etílico del ácido carbámico y aunque se conoce su potencial carcinogénico en animales de experimentación, la información en humanos todavía puede considerarse insuficiente, lo que incrementa y justifica el interés de su investigación.

Para la determinación analítica del CE se han propuesto varias metodologías, la mayoría de ellas con el uso de GC por el carácter volátil del analito, acoplada a diferentes detectores como el espectrómetro de masas - CG-EM, detección selectiva para nitrógeno/fósforo, detector electrolítico de conductividad de Hall, detector de Infra-rojo por transformada de Fourier, y detección por luminiscencia. El detector de masas acoplado al cromatógrafo de gases (CG-EM) ha sido preferido por ser selectivo, rápido, y no requiere de purificación y extracción de la muestra, en algunos casos se utiliza la microextracción en fase sólida (SPME) con diferentes tipos de fibras como método de tratamiento de la muestra. Se han reportado estas determinaciones para matrices muy variadas de vinos, grapas, aguardientes, saque entre otros.

El Comité Codex de la FAO/OMS sobre aditivos alimentarios y contaminantes estableció límite máximo para la presencia de carbamato en las bebidas fermentadas y destiladas.

Copyright © 2014. Este es un artículo de acceso abierto, lo que permite su uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

* Autor para la correspondencia: Magdalena Lorenzo, Email: magdalena.lorenzo@icidca.edu.cu

Teniendo en cuenta el rigor con el que se está trabajando internacionalmente nos proponemos desarrollar el método analítico para la determinación de este analito en nuestras condiciones, con la finalidad de controlar los niveles de CE en los parámetros reglamentados.

Palabras clave: bebidas alcohólicas, carbamato de etilo, cromatografía gaseosa-espectrometría de masas, microextracción en fase sólida (SPME)

ABSTRACT

Ethyl carbamate (CE), also known as carbamic acid ethyl ester or urethane ($H_2NCOOC_2H_5$), is a known genotoxic carcinogen in experimentation of animals, that is found in various alcoholic beverages and the information in human can still be considered insufficient what increases and it justifies the interest of its investigation.

Many analytical techniques have been developed for the determination and quantification of EC, most of them with the use of GC for the volatile character of the sample such as GC-flame ionization detection (FID), GC- mass spectrometry, GC thermionic specific (NPD), GC- Hall electrolytic conductivity detector (HECD), Fourier transform infrared (FTIR), and fluorescence detector (FLD) coupled high performance liquid chromatography. Mass spectrometer detector combined to gas Chromatography (CG-MS) is the most used of them because it is selective, quick, and it doesn't require of purification and extraction of the sample, solid –phase microextration (SPME) with different kind of fibber is a technique used for sample treatment. These determinations have been reported in different matrices in wines, liquors, spirits, grape and others.

The Committee Codex of the FAO/WHO has more than enough alimentary preservatives and pollutants that it established maximum limit for the carbamate presence in beverages and spirit.

Internationally many researchers are working in these topics. That is way our work will try to develop the analytic method for the determination of EC in our conditions, with the purpose of control the levels in the regulated parameters.

Key words: alcoholic beverages, ethyl carbamate, Gas Chromatography-Mass Spectrometric, solid –phase microextration (SPME)

1. INTRODUCCIÓN

Los congéneres son sustancias volátiles formadas junto al etanol durante la fermentación de las bebidas espirituosas.

El análisis completo es muy complejo y pueden clasificarse atendiendo a su concentración en:

1.-Volátiles mayoritarios. Aquellos que se encuentran en concentraciones suficientes para ser detectados por inyección directa en un cromatógrafo gaseoso. Su concentración mínima varía de 0.5 a 5 mg/litro.

2.-Volátiles minoritarios. Aquellos cuya concentración habitual es inferior al rango de 0.5 - 5.0 mg/litro y deben ser concentrados antes de realizar el análisis por CG. Salvo casos especiales el detector de elección es el de ionización por llama de hidrógeno (FID)

Por ser sustancias volátiles la técnica de análisis más indicada es la cromatografía de gases, porque es capaz de proporcionar muy buenas separaciones (incluso isómeros), además de ser la que más compuestos determina por unidad de tiempo, Dierksmeier, (2005).

Las bebidas destiladas presentan diversos congéneres volátiles a los que se le atribuye gran importancia en el aroma y la calidad de las mismas. Estos pueden ser detectados y cuantificados, para su control de calidad con análisis que completan la información para la caracterización con descriptores químicos que distinguen a los alcoholes, aguardientes y rones.

Por otra parte la identificación y cuantificación del compuesto con actividad carcinogénica como el carbamato de etilo (C.E.) o el metanol que en altas concentraciones es altamente tóxico ha conducido a numerosos estudios para entender mejor su formación y buscar soluciones para eliminarlos o reducir su contenido, Blanco I., (2008)

Dada la importancia que tiene el estudio del carbamato de etilo en bebidas alcohólicas, presentamos en este trabajo una reseña bibliográfica sobre la literatura publicada que se refiere a los mecanismos de formación y a los métodos analíticos utilizados en la identificación y cuantificación de este compuesto en bebidas alcohólicas y alimentos fermentados de alto consumo a escala mundial; teniendo como perspectiva futura el desarrollo del método analítico para la determinación de este analito en nuestras condiciones, con la finalidad de mantener los niveles de CE en los parámetros reglamentados.

2. DESARROLLO

2.1 Características del carbamato de etilo (CE)

El carbamato de etilo (CE) de fórmula química $H_2NCOOC_2H_5$ es también denominado uretano, es el éster etílico del ácido carbámico, es un sólido cristalino de color blanco que es soluble en agua, etanol y otros disolventes orgánicos. Años atrás se utilizó en el campo de la medicina, como un agente antineoplásico y como un co-disolvente para disolver analgésicos insolubles en agua, utilizados para el dolor post- operatorio y aunque se conoce su potencial carcinogénico en animales de experimentación, la información en humanos todavía puede considerarse insuficiente, lo que incrementa y justifica el interés de su investigación.

Su presencia es indeseable en alimentos, aunque el mismo no contribuye de forma negativa en sus propiedades sensoriales

La composición de C.E en bebidas es muy variable, pues su formación puede ser intensificada o inhibida en función de las prácticas de producción de estos productos, depende de las materias primas, condiciones de fermentación, destilación y por último de su almacenamiento. El mecanismo de formación de ésta sustancia en bebidas no esta completamente definido.

La complejidad de los materiales utilizados en su producción propicia diferentes vías para su formación y estas generalmente se desarrollan por la reacción entre el etanol y precursores nitrogenados, como la urea, el fosfato de carbamilo y los cianatos.

2.2 Técnicas analíticas que detectan y cuantifican el CE

Para la determinación analítica del CE se han propuesto varias metodologías, la mayoría de ellas con el uso de GC por el carácter volátil del analito, acoplada a diferentes detectores como el espectrómetro de masas - CG-EM.

Detector electrolítico de conductividad de Hall, se describe por Conacher y colaboradores en el que se reporta 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.

Aylott en 1987 describió tres métodos de preparación de las muestras según la fuente de la muestra y condicionado además 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 es para detecciones por espectrometría de masas y el tercero para muestras con mayor grado alcohólico que serán detectadas por espectrometría de masas (Aylott, 1987).

Canas en 1988 reportó un método simple y rápido para la determinación de carbamato de etilo utilizando cromatografía gaseosa usando como detector el analizador de energía térmica en el modo nitrógeno (N/TEA). En este caso se realiza una extracción previa de la muestra por cromatografía de columna usando alúmina activada y Celite 545 y se utiliza como eluyente el cloruro de metilo. Los límites de detección y cuantificación alcanzados por este método son de 1,5 y 3 ppb respectivamente (Canas, 1988).

Se han realizado análisis cromatográficos para identificación y cuantificación de carbamato de etilo en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 17A acoplado a un detector selectivo de masas Shimadzu modelo QP-5050A operado por el modo de impacto electrónico 70 eV con monitoreo del ión selectivo m/z 62. Se utiliza una columna cromatográfica HP-FFAP (50m x 0,30mm x 0,2µm) de fase estacionaria polietileno glicol esterificado.

El programa de temperatura utilizado en el horno fue de 90°C (2 min.), elevar a 10°C/min. hasta 150°C (0 min.), posteriormente elevar 40°C/min. hasta 230°C (10min.). Las temperaturas del inyector y de la interfase del detector fueron de 250 a 230°C, respectivamente.

El volumen de inyección fue de 2,0 µL en el modo splitless y el gas portador helio con un flujo de 1,5 mL/min.

Las muestras se analizaron sin tratamiento previo. Para la cuantificación se utilizó el método de adición de patrón y para el cualitativo monitoreo del ión m/z 62 y tiempo de retención. La confirmación fue realizada por adiciones sucesivas de solución patrón, observándose el área y simetría del pico

En la figura 1 observamos el espectro de masas por impacto electrónico con monitoreo del ión selectivo m/z 62 de carbamato de etilo, además en la (b) una solución patrón de 0,8 mg/L de C.E. y en la (c) un cromatograma de una de las muestras de aguardiente de

caña analizada. Se confirma que por el monitoreo del ión selectivo m/z 62, es posible identificar y cuantificar el C.E. sin dificultad de que exista una co-elución con otros compuestos presentes en la muestras de aguardiente.

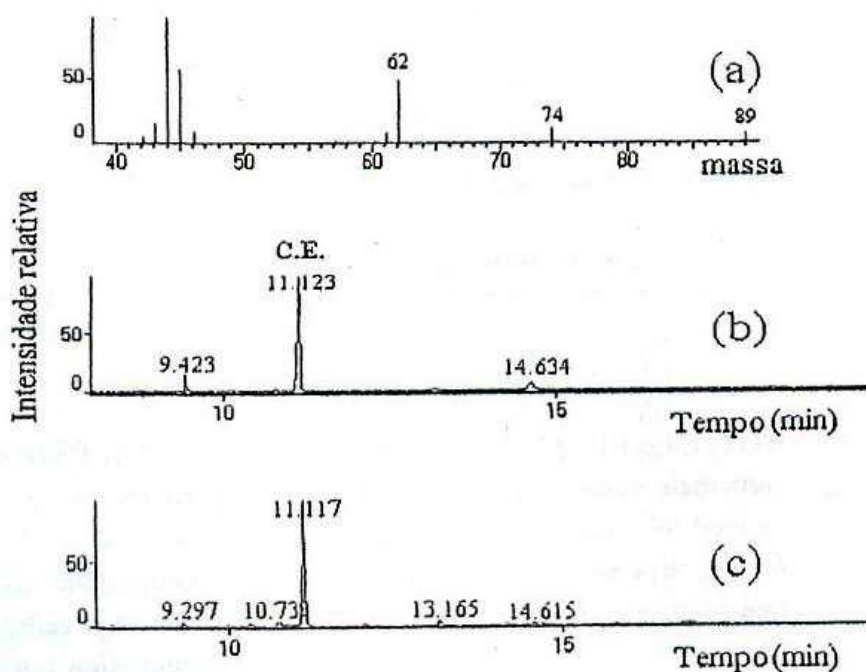


Figura 1. Espectro de masas por impacto electrónico con monitoreo del ión selectivo

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 mg/kg y de 0.5 mg/kg para detección por espectrometría de masa.

Una metodología analítica fue desarrollada por Perestrelo y colaboradores, (2010) con SPME combinada con cromatografía de gases y espectrometría de masas de tiempo de vuelo en 20 muestras de vinos fortificados.

Con detector de Infra-rojo por transformada de Fourier, y detección por luminiscencia, Lachenmeier, D y colaboradores, (2011) desarrollaron un método para determinar CE en bebidas a partir de frutas con semilla.

El método de detección por cromatografía líquida (LC) con detectores masa-masa (EM/EM) combinando con la extracción en fase sólida (SPE) desarrollado por Philippus y colaboradores (2011) se reporta como un método rápido, robusto y de procedimiento simple, se lograron valores de recobrado de 94.5%, con límites de detección (LODs) entre 0.25 y 0.63 $\mu\text{g l}^{-1}$ en las diferentes matrices.

Un estudio bibliográfico realizado por Martínez y col, en el 2003 refiere los trabajos, realizados Ming-liang, Fu y colaboradores que desarrollaron un método para vino de arroz por cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia y Madrera y colaboradores también utilizaron este detector en matriz de sidra; de Canas y colaboradores 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/EMS). En este estudio realizado en 17 laboratorios se han aplicado las siguientes técnicas:

Las Columnas de extracción en fase sólida han sido usadas para la extracción de líquidos con cloruro de metileno.

La detección selectiva de masas ha comenzado a estar recientemente más disponible a pesar de su elevado costo, 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, principalmente el último es el más reportado.

El CG-EM ha sido preferido por ser selectivo, rápido, y no requiere de purificación y extracción de la muestra. Se han reportado estas determinaciones para matrices muy variadas de vinos, uvas, sidras, aguardientes, saque, entre otros.

En 1996 la cromatografía de gases multidimensional ha sido empleada por Yaping. 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 (Yaping, 1996).

Wang en 1997 realizó estudios para determinar el contenido de uretano en bebidas alcohólicas destiladas comerciales y obtuvo como resultado que las muestras analizadas de bebidas no destiladas que contienen arroz como materia prima principal muestran los mayores niveles de uretano. Sin embargo no se detectó uretano en las bebidas donde las uvas se utilizaron como material principal para la fermentación (Wang, 1997).

José Carlos Baffa Júnior y colaboradores en el 2011 con el fin de investigar la presencia de carbamato de etilo en el vino y en las fracciones del proceso de destilación emplearon una cromatografía de gases acoplada a una espectrometría de masas. Después de la fase de fermentación, el vino mostró un contenido promedio de 122 mg/L de carbamato de etilo y para las fracciones del proceso de destilación: cabeza 59.7 mg/L, corazón 52.1mg/L y cola 1.57mg/L. Los resultados demostraron que este método es esencial para separar las fracciones del proceso de destilación y para garantizar la calidad del producto, con respecto al contenido de carbamato de etilo (José Carlos Baffa Júnior, 2011).

Entre los tratamientos de muestras se reporta el uso de la extracción en fase sólida y la microextracción.

La determinación de CE en vinos de uvas utilizando microextracción en fase sólida con fibras del tipo carbowax/divinylbenzeno (con 30 min de exposición a 70 °C) utilizan cloruro de sodio para favorecer la ocurrencia del salting out a pH neutro.

En otros casos se ha utilizado el sulfato de sodio anhidro con esta misma finalidad. Fibras polietilén glicol/ aceite de silicona con grupos hidroxilo para favorecer la transportación del CE al espacio de cabeza eliminar el efecto matriz fueron utilizadas por Zhang Ying y colaboradores (2008).

En sus trabajos Cardoso, A. M. utiliza fibras de carbono con ácido metacrílico-anilino trietoxi silicona con un diseño factorial que incluye selección de parámetros como tiempo de extracción, temperatura, concentración de la sal, tiempo de desorción y pH. Scollo D y Col, (2011) siguiendo la metodología oficial de la AOAC (2007), realizaron determinaciones de C.E. en matrices de bebidas destiladas y saque utilizando un cromatógrafo de gas marca Thermo modelo Trace GC Ultra, acoplado a detector másico Thermo modelo DSQ-2 Columna microbore BPX 70 de SGE, conteniendo 79%

de ciano-propilpolifenilsiloxano, de carácter polar. Su longitud es de 30 metros x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor del film (fase estacionaria). Siguiendo las especificaciones del método oficial AOAC, el CE tiene un tiempo de retención aproximadamente a los 15 minutos mientras que el estándar interno carbamato de propilo está aproximadamente a los 20 minutos.

Columnas spme de 50 mL Chem Elut de Varian, con un diámetro de partícula de 80-100 mesh (88%), 0,03-0,08 mesh (0,05%) presentando una saturación del agua absorbida en el rango 245-405%. Los estándares de carbamato de etilo o uretano y carbamato de propilo son Sigma y tienen una pureza mínima del 99% respectivamente (TLC y GC).

2.3 Leyes que regulan las concentraciones de CE en bebidas

Actualmente por el potencial carcinogénico del C.E. se ha incentivado la introducción de métodos para reducir internacionalmente los límites del nivel de exposición humana a este compuesto. Estos métodos han tenido éxito y se ha demostrado en estudios realizados en los EE.UU. (en algunas bebidas alcohólicas), en el Reino Unido (solamente en whisky), en Canadá y Australia (en alimentos y bebidas) una marcada disminución de los niveles de C.E. en estos alimentos.

Además, en la salud pública de Canadá, como uno de los métodos para disminuir los niveles de consumo del C.E., se ha aprobado el uso de una levadura genéticamente modificada en la producción de bebidas alcohólicas fermentadas. Estas bebidas han desplegado una marcada disminución en el nivel del C.E. de hasta un 89%, (Health Canada B, 2007).

El Comité Codex de la FAO/OMS sobre aditivos alimentarios y contaminantes estableció en 1993 un máximo de referencia de 30 ppb en vinos de mesa. La legislación en los Estados Unidos regula su límite a un máximo de 15 ppb (US FDA, 2000) en las bebidas fermentadas y destiladas su valor no debe ser superior a 125 ppb

Es su 64º reunión en febrero de 2005, el Comité Experto FAO/OMS en aditivos alimentarios (JEFCA) consideró especial atención para el carbamato de etilo y elaboró un informe en el que se aconseja garantizar las buenas prácticas de elaboración con el objetivo de reducir el contenido en carbamato de etilo en bebidas alcohólicas (Food Standards Agency, 2005)

2.4 Acciones preventivas a tener en cuenta durante las buenas prácticas de producción para minimizar la formación de carbamato de etilo.

1. Evitar excesiva fertilización en los campos.
2. Monitorear el nitrógeno presente en los suelos.
3. No realizar cosechas recubiertas si conoce que los niveles de nitrógeno son realmente altos en el suelo.
4. Ser consciente de la fuerte respuesta al nitrógeno que tienen los diferentes cultivos y especialmente su existencia en las raíces.
5. Monitorear el nitrógeno presente en los jugos.
6. No adicionar excesivos suplementos de nitrógeno de manera rutinaria.
7. No adicionar urea como suplemento de nitrógeno en los suelos.

8. Las bacterias que se utilicen en la fermentación deben haber sido bien caracterizadas.
9. Una mayor fortificación de los suelos puede agravar el problema de la excreción de urea por la levadura.
10. Monitorear los niveles de CE en los destilados.
11. No deben exponerse los destilados a elevadas temperaturas durante su almacenaje y transporte.

3. CONCLUSIONES

Se investigó la importancia y aplicabilidad de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masa como herramienta útil en la determinación y cuantificación de carbamato de etilo en aguardientes y bebidas destiladas en nuestro país. La microextracción en fase sólida (SPME) para la preparación de muestras, ofrece alternativas muy novedosas y buenos resultados. Se encontraron métodos analíticos que pueden ser utilizados en la determinación y cuantificación de carbamato de etilo.

La aplicación de acciones preventivas durante las buenas prácticas de producción puede ser factor determinante para minimizar la formación de carbamato de etilo y mantener los niveles en los parámetros reglamentados.

El desarrollo del método analítico para la determinación de carbamato de etilo en nuestras condiciones nos permitirá tener una visión general de las producciones de las destilerías y roneas del grupo AZCUBA, principalmente bebidas que tengan fines exportables.

REFERENCIAS

- AOAC (Official Methods of Analysis), Ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce, Official method 994.07, 2007.
- Aylott, R. I., et al., J. Inst. Brew., 1987, 93 pp.382-386.
- Baffa, Junior, José, Carlos, Santos Mendonca, Regina Célia, Kluge Teixeira Pereira, Joesse Maria de Assis, et al. Química de los Alimentos, Vol. 129, No. 4, 2011, pp. 1383-1387 doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.069.
- Blanco, I., Lorenzo, M., Ataíde da Silva, A., Estudio preliminar del carbamato de etilo en aguardientes y bebidas alcohólicas destiladas., Memorias del X Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados, Diversificación 2008, pp. 204-209. ISBN 978-959-7165-16-3.
- Canas, B. J., et al., Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and foods by gas chromatography with mass selective detection: collaborative study., J. of AOAC International, Vol. 77, 1994, pp.1530-1536.
- Canas, B. J., et al., Rapid gas chromatographic method for determining ethyl carbamate in alcoholic beverages with thermal energy analyzer detection., J. Assoc. Off Anal. Chem, Vol. 71, 1988, pp. 509-511.
- Cardoso, D. R., Andrade Sobrinho, L.G., Lima-Neto, B. S., Franco, D. W., A Rapid and Sensitive Method for Dimethylsulphide Analysis in Brazilian Sugar Cane Sugar Spirits and Other Distilled Beverages., J. Braz. Chem. Soc., Vol. 15, No. 2, 2004, pp. 277-281.

- Centrodartigos.com/artículos-útiles/article_106139.html. El carbamato de etilo en bebidas y alimentos, peligros, compuestos relacionados.
- Dierksmeier, G., Libro sobre Métodos de separación., Cap. 3 Cromatografía gaseosa Editorial Científico-Técnica, 2005, pp. 40-254.
- Food Standards Agency UK, Survey of Ethyl Carbamate in Whisky, Food Surveillance. Information Sheet Number 02/00, available at: <http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis2000/2whisky>, 2000.
- Health Canada B., Novel Food Information: *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strain ECM01, available at: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/nf-an148decdoc_e.html, 2007.
- Lachenmeier, D. W., *et al.* La calidad de manera ilegal y el alcohol de producción informal en Europa: resultados del proyecto ÁNFORA, Adicciones., Vol. 23, No. 2, 2011, pp. 133-140.
- Martinez, A.J. y Blanco, I., Formación e identificación de carbamato de etilo en bebidas alcohólicas y alimentos fermentados. *Ars Pharmaceutica*, Vol. 41, No.2, 2000, pp. 159-165.
- Perestrelo, R.; *et al.*, Integral de dos dimensiones cromatografía de gases con espectrometría de masas de tiempo de vuelo en combinación con la microextracción en fase sólida como una herramienta poderosa para la cuantificación de etilo carbamato en los vinos fortificados. El estudio de caso del vino de Madeira., *Journal of Chromatography*: 1217, Vol. 20, pp. 3.441-3.445. DOI:10.1016/j.chroma.2010.
- Philippus, A.; *et al.*, Development of a novel solid-phase extraction, LC-MS/MS method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages: application to South African wine and spirits. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment.*, Vol. 28, No. 7, 2011, pp. 826-839, DOI: 10.1080/19440049.2011.568010.
- Scollo, D., Vicente, F., Giraud, M., Mora V., Kulhawik D., Determinación de los niveles del carbamato de etilo en bebidas que usan bacterias lácticas además de levaduras. Copy Right Publitec. Av.HonorioPueyeredón550 - CABA (1405) – Argentina, 2011.
- US Food and Drug Administration, Urethane in Alcoholic Beverages Under Investigation. US Consumer, available at: <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/fc0293ur.html>, 1993.
- Wang *et al.*, Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages retailed in Taiwan *Chinese agricultural Chemical Society*, Vol. 35, 1997, pp. 40-51.
- Yaping *et al.*, Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with multidimensional gas chromatography / isotopic dilution mass spectrometry., *Fenxi Huaxue*, Vol. 24, 1996, pp: 36-40.
- Zhang, Y., Zhang, J., Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages using a face-centered cube central composite design., *Analytical Chemical Acta* 627, 2008, pp. 212-218.