

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2014.04.06

发酵酒中氨基甲酸乙酯的研究进展

王 博,齐晶瑶*

(哈尔滨工业大学市政与环境工程学院,哈尔滨 150090)

摘要:对发酵酒中氨基甲酸乙酯(Ethyl carbamate,EC)的致癌机理、检测方法、形成机制、前驱物质及控制方法等方面进行综述。阐述目前研究进展的同时,对存在问题进行分析并提出解决设想及应用展望。氨基甲酸乙酯可由自然反应及添加前驱物质两种方式形成,其致癌机理是通过两种不同途径破坏DNA结构。通常情况,主要通过减少前体物质的添加和形成抑制氨基甲酸乙酯的生成。氨基甲酸乙酯的通用检测方法为色谱与不同检测器结合使用或色谱与质谱联用,其中,检测前的样品前处理有液液萃取,固相萃取等不同形式。目前,我国检测控制工作虽然已经取得一定进展,但是检测方法不够经济有效,控制方法不能够普遍应用。关于控制方法的最新研究中,基因工程技术与系统生物技术的相关应用纳入进程,后基因组研究和蛋白质学等对基因的应用改造处于探索阶段。随着关于氨基甲酸乙酯的危害、形成机理等方面的研究不断深入,不同机制的控制方法不断出现。EC的处理逐步进入更加完善的状态。

关键词:发酵酒;氨基甲酸乙酯;致癌机理;检测方法;形成机制

中图分类号:TQ457.2+2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2014)-04-269-07

Research development of ethyl carbamate in fermented wine

WANG Bo, QI Jingyao*

(Municipal and environmental engineering school, Harbin institute of technology, Harbin 150090, China)

Abstract: The carcinogenic mechanisms, detection methods, formation mechanisms, precursors and control methods of EC in fermented wine are summarized. This paper expounds the development of research and existing problems and proposes imagination on solution and prospect for application, integrating its current situation. EC damages the structure of DNA by two main mechanisms of carcinogenesis. EC can be produced by two paths including nature reaction and addition which contains precursor and inhibition of EC mainly coming from controlling the additive or formation of precursors. Chromatography combined with different detectors or chromatography with mass spectrometry are identified as universal detections. Besides, there are multiple methods of pretreatment as LLE, SPE and so on. Currently, the researches on control and detection have made some progress in our country, but the existing methods of detection cannot be effective and economic. Meanwhile, control methods cannot be widely used. In the recent researches on control methods, related applications of genetic engineering and biotechnology have been made into the process. What in the exploration stage is that people investigate the genetic modification of Post-genomic and proteomics. As respective aspects' researches including the dangers and formation mechanism go deeply into the realities of life gradually, different control methods corresponding to different mechanisms appear successively. The process of EC comes into more complete state.

Keywords: Fermented wine; Ethyl carbamate; Carcinogenic mechanisms; Control methods; Formation mechanisms

氨基甲酸乙酯是发酵饮料和发酵食品在发酵和贮存过程中产生的一种化学污染物,我国包括葡萄

酒在内的发酵饮料中均含有微量的 EC^[1]。氨基甲酸乙酯的研究早在 20 世纪中期开始。20 世纪 40

收稿日期:2014-05-27;修回日期:2014-09-19.

作者简介:王博,女,硕士研究生,研究方向:市政工程;E-mail:me_bo1991@sina.com.

* 通信作者:齐晶瑶,女,教授,博导,研究方向:市政工程;E-mail:jyq@hit.edu.cn.

年代, Nettleship 实验证明了氨基甲酸乙酯 (Ethyl carbamate; Ethyl urethane; carbamic acid ethyl ester, 简称为 EC) 具有致癌作用^[2]。其可引发肺肿瘤、淋巴瘤、皮肤癌等。20 世纪 70 年代初期, Lofroth 等^[3]发现发酵食品中含有氨基甲酸乙酯, 70 年代末期, Ough 在酸乳酪和酒精中检测到了氨基甲酸乙酯^[4], 2007 年, 国际癌症研究机构 (IARC) 正式将 EC 归类为 2A 类致癌物 (人类可能致癌物)^[5]。

EC 能够快速地被人体器官与皮肤吸收, 经过三种作用完成代谢过程, 两种构成致癌作用: 0.5% 的 EC 氧化为乙烯基-氨基-甲酸乙酯, 进而形成环氧化物, 破坏 DNA 正常作用; 二是 0.1% 氧化为 N-羟基-氨基甲酸乙酯, 同时生成过氧化氮, 后诱导 Cu²⁺ 调控的 DNA 碱基突变^[6-7]。90% 以上 EC 经肝内的酯酶分解为乙酸、氨和碳水化合物等, 此过程为无毒途径。

鉴于此, 欧美各国于 20 世纪初陆续制定了 EC 的限定标准, 1985 年, 加拿大对各种类型酒进行了限定: 佐餐酒 30 μg·L⁻¹、加强葡萄酒 100 μg·L⁻¹、蒸馏酒 150 μg·L⁻¹、日本清酒 100 μg·L⁻¹。美国限定葡萄酒与加强葡萄酒分别不得超过 15 μg·L⁻¹ 和 60 μg·L⁻¹^[2,8]。

EC 主要形成在发酵、加热或蒸馏以及储存过程^[9], 国产酒中, 黄酒中的含量最高超过 500 μg·kg⁻¹, 白酒比黄酒略低, 葡萄酒中最低, 一般低于 40 μg·kg⁻¹^[10]。我国对黄酒中 EC 的研究较早, 对白酒缺乏基础研究, EC 的研究是近几年才开始的^[11]。我国的传统酒酿造有着悠久的历史, 随着人们消费水平的提高, 中国传统酒类逐渐迈向国际化。因此, 对各种酒中致癌物质含量的限定势在必行。

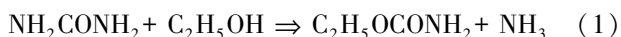
1 EC 形成机制及前驱物

EC 形成与其前驱物质、温度、光、催化剂有关。

1.1 自然反应产生氨基甲酸乙酯^[8]

1.1.1 尿素与乙醇生成 EC^[6,8,12-14]

尿素普遍存在于烘焙, 发酵食品中, 尿素一直作为酵母的氮源而添加到发酵液中。Wang D 等研究发现尿素与乙醇能够生成 EC (见式 1)。



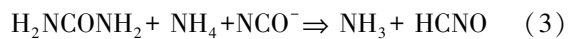
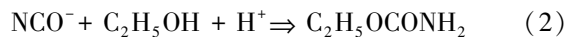
在发酵酒酿造过程中, 尿素的来源主要有两个方面: 发酵前作为酵母氮源添加到发酵液中; 由酵母菌降解精氨酸生成。精氨酸在粮食中含量较高, 它为酵母菌的生长提供丰富的氮源, 是尿素产生的重要来源。尿素浓度、乙醇含量、温度及反应时间等各个因

素都与 EC 生成量呈正相关关系。尤其在葡萄酒和黄酒中, 尿素是酸性条件下生成 EC 的主要前体。

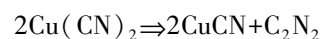
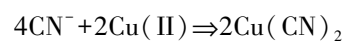
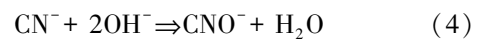
1.1.2 氰化物与乙醇生成 EC^[8,15-17]

Bruno 经过研究发现, 蒸馏酒中 EC 的形成也可能是氰化物被氧化成氰酸后, 氰酸和乙醇反应产生 EC (见式 2)。

尿素可能在 60 °C ~ 100 °C 的乙醇水溶液中分解成氰酸或异氰酸盐, 或在准备过程中受热分解后生成氨与氰酸 (见式 3), 后氰酸根与乙醇反应生成 EC。



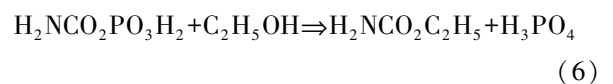
发酵过程中存在于植物中的氰化物参与了 EC 的形成反应。反应过程中乙醇、连二碳基化合物、光线和氧气起了作用。特别在见光后, 在二价铜催化作用下^[18], 氰化物生成氰酸盐, 最终导致 EC 的生成 (见式 4、式 5)。



二价铜或三价铁能催化氰酸盐与乙醇的反应, 有利于 EC 形成 (在蒸馏中气相形态过程同上)。生成 EC 的过程与 PH、光、乙醇含量、温度及催化金属物质浓度有关。蒸馏酒中氰酸盐及其异构体是主要的 EC 前体物质。

1.1.3 氨甲酰磷酸与乙醇生成 EC^[2,15]

氨甲酰磷酸是形成氨基甲酸乙酯的前体物质^[19], 20 世纪 70 年代 Ough 证明 EC 可以由氨甲酰磷酸和乙醇反应形成 (见式 6)。酵母中的 ATP、CO₂ 和铵在氨甲酰磷酸合成酶作用下生成氨甲酰磷酸。

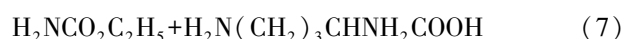
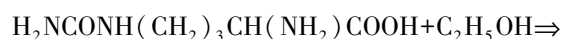


成品葡萄酒中 EC 绝大部分由尿素生成, 由尿素形成的 EC 远多于由氨甲酰磷酸形成的 EC。

1.2 添加物中前驱物反应生成氨基甲酸乙酯^[7]

1.2.1 瓜氨酸与乙醇生成 EC^[20-21]

瓜氨酸与乙醇形成氨基甲酸乙酯的反应式如下 (见式 7):

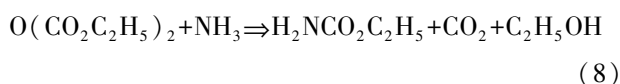


有研究者发现, 在葡萄酒酿造过程中, 通过向新鲜的葡萄汁中添加乙醇, 经过 70 °C 加热 48 h 后会有 EC 产生, 且这种 EC 的产生与新鲜葡萄汁中有酸性脲酶无关, 这一现象表明在新鲜葡萄汁中很可

能存在形成 EC 的前体物质。经过深入研究发现,瓜氨酸能与乙醇直接自发反应生成 EC,且在葡萄汁中均含有一定量的瓜氨酸,所以有研究者认为瓜氨酸就是形成 EC 的前体物质。但也有研究表明,葡萄酒中 EC 生成量和瓜氨酸含量并不具有线性关系,所以这一方面还有待进一步研究。

1.1.2 焦碳酸二乙酯和氨反应形成 EC^[21]

早在上世纪 60 年代,焦炭酸二乙酯由于能有效杀死葡萄酒中的酵母、细菌而被广泛应用。到 1962 年,Thoukis 等发现了葡萄酒中存在焦炭酸二乙酯与氨的反应,最终可以形成有致癌作用的氨基甲酸乙酯(见式 8)。由此,焦炭酸二乙酯禁止在葡萄酒生产中使用。



CO₂与胺反应生成氨基甲酸和氨基甲酸盐也可能是 EC 生成的一个简单的途径,这已由 Dijkstra 于 2007 年证实^[8]。

2 EC 前驱物的控制方法

目前国际上通用的思路是设法降低发酵液中 EC 的主要前体物质的含量,来控制其生成。

2.1 选用优良的菌株^[22-23]

酵母在生长繁殖和酒精发酵过程中,合成的尿素除满足自身需求外,剩余的被分泌到细胞外,而增加了酒醪中尿素含量,酒醪尿素进一步与乙醇反应生成 EC。巫景铭等研究表明不同菌种发酵液中 EC 的含量差异很大^[24]。由于大多数乳酸球菌和乳酸杆菌都具有分解精氨酸产生瓜氨酸的能力,所以选择纯种进行发酵至关重要。随着当今科技的发展以及基因工程等技术的应用,选育产尿素能力差的酵母菌和乳酸菌进行纯种发酵,从来源上控制酒醪中的尿素,是降低 EC 含量的有效方法。日本学者已经研究出用紫外线照射的方法进行诱变育种,我国王德良等通过激光和亚硝基胍复合诱变法筛选得到了突变型低产尿素黄酒酵母菌株,效果证实良好。^[25]

2.2 添加酸性脲酶法^[20]

在发酵完全的酒液中添加外源酸性脲酶可使尿素及时分解为氨和二氧化碳,从而达到减少 EC 生成的目的。此方法操作简单、方便,且不改变原酿造酒的菌种和生产工艺。耿子欢等对黄酒中 EC 进行研究^[26],指出使用酸性脲酶在最佳条件:酶浓度 150 mg·L⁻¹、处理温度为 25 ℃,pH 值为 3.5,处理时间 10 d。日本的 Takeda 化学工业公司在一种发酵乳酸杆菌细胞中发现了能有效地分解葡萄酒中的尿

素酸性脲酶;2009 年日本武田制药公司从乳酸菌中分离出一酸性尿酶产生菌,可以达到少量高效的效果。添加酸性脲酶是降低酒中尿素浓度的主要方法。目前,葡萄酒和日本清酒均选用酸性脲酶处理酒中尿素,鉴于价格较高,方法还有待探索研究。

2.3 控制发酵条件

以上两种方法均旨在通过减少发酵酒中尿素含量控制 EC 的生成,适用于如黄酒,葡萄酒中,尿素为其主要前驱物的情况。但对于白酒,白兰地等其它发酵酒,EC 前驱物主要为氰化物^[27],因此需要其它方法进行控制。

据意大利 Gaetano 等的研究,EC 的生成量随温度、pH 值上升,而趋于升高。控制一定的发酵温度及 pH 值,对于降低酒中 EC 含量是十分有益的^[15]。

白酒中 EC 含量随着贮酒时间加长而增长,适当控制贮酒的时间有助于 EC 含量的减少。

含铜物质可作为 EC 生成的催化剂(前文已述),在传统的制酒工艺中,采用铜制容器作为蒸馏器。对于此种情况,有两种初步解决方法:

将铜制容器改成不锈钢容器进行蒸馏^[7]

向容器内加入阳离子交换树脂或不溶性螯合物,与铜离子生成不溶配合物^[28]。

树脂的再生可能有气味,碳酸钙或碳酸镁可供选作交换树脂,但是相关研究较少,需要进一步研究确认应用效果。

3 EC 的分离及检测

3.1 气相色谱/火焰离子化检测器(GC/FID)^[8]

GC/FID 目前为最普遍的 EC 测定方法。GC 采用极性柱,取丙氨基甲酸酯(PC)或丁氨基甲酸酯(BC)作为内标。为达到准确量化的目的,一般采用 C¹³或 N¹⁵作为同位素标记。当 EC 浓度较低时,采用不同的萃取和浓缩预处理方法减少干扰,从而提高检测的准确度和灵敏度。

3.2 气相色谱/热离子检测器(GC/TSD)^[8,15]

对于吸附有 EC 的固体物质可用 GC/TSD 方法测定。采用不同极性的耦合毛细管柱 GC 与 TSD 联用可鉴定出不同发酵酒精液体中的 EC。样品溶液使用 6 molNaOH 溶液与饱和 KCL 溶液调至 PH = 10,而后采用二氯甲烷进行液液萃取,同时加入无水 Na₂SO₄干燥,随后进行低压浓缩。残渣转移至浓缩管后缓慢通入氮气流,直至提取物体积减少至 0.5 mL。本法前处理简便,分析速度快,灵敏度高,分析线性范围宽,选择性很强,干扰性小,适合于粮食中氨基甲酸乙酯的分析,样品回收率高。最低检

测量为 $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

3.3 气相色谱/质谱 (GC/MS)^[29-30]

GC/MS 可采用选择离子检测 (SIM) 方式定性及定量,能减少杂质的干扰,灵敏度较高。该法已被列入 AOAC (994.07) 检测酒精饮料及酱油中 EC 的标准方法^[6]。预处理过程对于检测至关重要,目前比较广泛的预处理方法有:液液萃取 (LLE)、固相萃取 (SPE)、固相微萃取 (SPME)^[31]。

3.3.1 液液萃取 (LLE)

液液萃取是传统的预处理方法。梁新红通过实验得出液液萃取法萃取葡萄酒样品中 EC 时的最佳参数为:酒样溶液的 pH 为自然 pH, KCl 用量为 16 g (40%), 二氯甲烷用量为 $3\times 100 \text{ mL}$ ^[32]。方法的检出限为 $8.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 回收率在 76.56%~80.39%, 相对标准偏差在 4.42%~9.82%。液液萃取法用于葡萄酒中 EC 含量的定量检测,操作简便,但乳化现象严重,操作系统误差较大,方法的精密度及准确度均较低。萃取剂多有毒且消耗量大,可能造成环境污染。

3.3.2 固相萃取 (SPE)

我国进出口商品检验行业标准 SN 0285-93 中^[33], 出口酒类中 EC 残留量检测采用二氯甲烷提取, 然后进行 GC/MS 分析, 国外多采用固相萃取技术, 准确度高、重现性好。1998 年, 国际葡萄与葡萄酒组织 (OIV) 推荐 Dennis 首先提出的用 SPE 柱进行 EC 提取前处理, 后续程序加上二氯甲烷洗脱的方法为标准的前处理方法^[34]。刘丽红等以氘代同位素为内标, 采用硅藻土固相萃取柱进行萃取, 乙醚洗脱, GC-MS 选择离子法测定^[35-36]。检出限为 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 回收率 91.0%~102.0%, RSD 为 1.8%, 精密度和准确度高, 且简便快捷。谭文渊, 袁东等采用 GC/MS 测定白酒中氨基甲酸甲酯与氨基甲酸乙酯含量, 样品采用氨基固相柱萃取净化、氮吹浓缩定容^[37]。结果表明氨基甲酸甲酯和氨基甲酸乙酯在 $2\sim 30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.992 3、0.981 1, 平均回收率 76.10%、75.43%, RSD 为 4.48%、4.00%。该方法可应用于白酒检测。

3.3.3 固相微萃取 (SPME)^[38]

SPME 方法是样品前处理的新方法, 其在缩短萃取时间, 无需萃取溶剂方面的优点将是样品前处理方法发展的方向, 在萃取头涂层材料的热稳定性及涂渍性能方面继续改进, 将具有其它萃取方法无可比拟的优点^[32]。方法简便、快速且不需萃取溶剂, 环保, 但精密度和准确度较低。Lachenmeier 报道了 SPME 用于萃取核果饮料中 EC 含量分析的方法^[39]。王利平等用固相微萃取气质联用分析黄酒

中氨基甲酸乙酯, 萃取头使用 50/30 $\mu\text{mDVB}/\text{CAR}/\text{PDMS}$, 萃取温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 萃取时间 25 min, 选择离子采用 m/z 62 和 74, 采用外标定量法, 检出限为 $1.21 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($s/n=3$), RSD 为 2.48%, 回收率为 94%~107%^[40]。史斌斌, 徐岩等用顶空固相微萃取 (HS-SPME) 技术与 GC/MS 联用, 测定蒸馏酒中 EC 含量^[41]。样品蒸馏后旋转蒸发浓缩, 以氨基甲酸丙酯 (PC) 为内标, 设计了三因素三水平正交实验。实验发现, 最佳条件是采用 PA 萃取头, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 下萃取 45 min。该方法简便快速、灵敏, 自动化程度高, 能够对蒸馏酒中 EC 进行简捷、快速地定量。

3.4 高效液相色谱结合荧光检测器 (HPLC-FLD)^[42]

Melo 等首次报道了用 HPLC-FLD 检测酒精饮料中的 EC, 这种方法不需要对样品进行预处理, 但方法的准确度和精确度较低^[43]。但为了提高方法的灵敏度, 加大取样量即衍生试剂的量也随之增加, 或者对酒类样品进行浓缩^[44]。高年发、宝菊花等用 HPLC-FLD 方法测定了白兰地中的 EC^[45]。经过实验得到最优的检测条件是: 荧光检测入射光波长为 234 nm, 发射光波长为 600 nm; 流速为 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 流动相梯度 (0~10 min, A 相为 55%, B 相为 45%; 10~35 min, A 相为 50%, B 相为 50%; 35~40 min, A 相为 0%, B 相为 100%); 荧光反应时间为 5 min。陈达炜、苗虹等采用该方法进行白酒中 EC 含量研究, 发现在一定酒精度范围内, 酒精度与 EC 含量具有良好的线性关系^[46]。该方法在 $10\sim 500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系, 定量限为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 加标回收率为 98.9%~108.2%, 相对标准偏差为 0.6%~4.9%。HPLC-FID 方法可快速测定白酒中 EC, 适用于大量实验筛选, 简单、灵敏、准确, 但不适用于精确定量。与 GC-MS 相比, HPLC 方法偏差更大一些, 但是测定同等浓度的 EC 时, HPLC 更加简单, GC-MS 更耗时^[7]。

3.5 傅立叶变换红外光谱仪 (FTIR)

Lachenmeier 用傅立叶变换红外光谱仪, 选择性波段, 结合最小二乘法对核果酒精饮料中的 EC 含量进行快速检测, 标准偏差在 $0.29\sim 0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 加标回收率为 77%~91%^[47]。该方法不需要进行前处理, 检测每个样品只需要两分钟, 因此与 GC/MS 相比它的处理量更大。此外, 一些 EC 形成期间储存的前驱物等也可以从傅立叶变换红外光谱仪光谱中得到。但定量检测缺少准确度, 仅适用于半定量检测, 需要对大量参考样品进行分析校核。

4 结论与展望

目前, 食品行业暴露的问题不胜枚举, 氨基甲酸

乙酯的安全问题也已经引起了世界各国的普遍关注,关于 EC 的分析检测工作还需要不断深入。我国关于白酒中 EC 含量的报道较少,应当通过研究,提供数据资料,尽早制定我国酒类中氨基甲酸乙酯的检测标准和限量标准,进一步开拓国际市场。

我国的相关研究、检测及控制工作已经取得一定进展,但是没有一种 EC 含量控制方法能够适用于所有发酵酒。简捷、有效、价格低廉的检测方法还有待于开发;适用性广,操作性强,价格适中的 EC 控制方法还需要科技人员继续研究。

我国科技发展迅速,继基因工程技术和代谢工程的系统生物技术等现代技术的发现,能够更加充分发挥现有工业微生物菌种潜力,创新工业生物技术的生产流程。随着后基因组研究和蛋白质组学的提出,基于微生物系统生物技术的发现,将不断发现重要的关键基因,明确关键的代谢机制,尤其是相关酶基因及其蛋白产物,利用该技术进行基因改造,完成传统技术的现代化改造^[48]。

参考文献(References)

- [1] 陈达炜, 荫硕焱, 高洁, 等. 高效液相色谱-荧光法测定葡萄酒中氨基甲酸乙酯的含量[J]. 卫生研究, 2014, 43(1): 121-124.
CHEN Dawei, YIN Shuoyan, GAO Jie, et al. Determination of ethyl carbamate in wine by HPLC-FLD[J]. Journal of Hygiene Research, 2014, 43(1): 121-124.
- [2] 高年发, 宝菊花. 氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 中国酿造, 2006, (09): 1-4.
GAO Nianfa, BAO Juhua. Research advancement of ethyl carbamate[J]. China Brewing, 2006, (09): 1-4.
- [3] LOFROTH G, GEJVALL T. Diethyl pyrocarbonate: Formation of urethan in treated beverages [J]. Science, 1971, 174(15): 1248-1250.
- [4] OUGH C S. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. II. Possible formation of ethyl carbamate from diethyl dicarbonate addition to wine [J]. J Agric Food Chem, 1976, 24(2): 328-331.
- [5] 肖泳, 邓放明. 发酵食品中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(3): 216-221.
XIAO Yong, DENG Fangming. Research progress on ethyl carbamate in fermented food [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2012, 3(3): 216-221.
- [6] 管政兵. 酿造酒中氨基甲酸乙酯控制的研究进展及对 中国黄酒的借鉴 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 374-378.
GUAN Zhengbing. Research progress in the control of ethyl carbamate in fermented alcoholic beverages and its references giving for Chinese rice wine [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(20): 374-378.
- [7] SAKNO K, OIKAWA S, HIRAKU Y, et al. Metabolism of carcinogenic u-rethane tonitric oxide is involved in oxidative DNA damage [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2002, 33(5): 703-714.
- [8] WEBER J V, SHARYPOV V I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review [J]. Environmental Chemistry Letters, 2009, 7(3): 233-247.
- [9] BATTAGLIA R, CONACHER H B S, PAGE B D. Ethyl carbamate(urethane) in alcoholic beverages and foods: A review [J]. Food Additives & Contaminants, 1990, 7(4): 477-496.
- [10] WU P, PAN X, WANG L, et al. A survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang, China [J]. Food Control, 2012, 23(1): 286-288.
- [11] 范文来, 徐岩, 史斌斌. 酒酯发酵过程中氨基甲酸乙酯与尿素的变化 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 172-174.
FAN Wenlai, XU Yan, SHI Binbin. Evolution of ethyl carbamate and urea from fermented grains in the fermentation process of Chinese liquor [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(23): 172-174.
- [12] 王晓娟, 王德良, 傅力, 等. 降低发酵酒中尿素含量的研究进展 [J]. 酿酒科技, 2009, 176(2): 93-95.
WANG Xiaojuan, WANG Deliang, FU Li, et al. Research progress in reducing urea content in fermenting wine [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2009, 176(2): 93-95.
- [13] WANG D, YANG B, ZHAI X, et al. Synthesis of diethyl carbonate by catalytic alcoholysis of urea [J]. Fuel Process Technology, 2007, 88(8): 807-812.
- [14] 夏艳秋, 朱强, 汪志君. 谨防黄酒中氨基甲酸乙酯的危害 [J]. 酿酒, 2004, 31(3): 51-53.
XIA Yanqiu, ZHU Qiang, WANG Zhijun. Warning of ethyl carbamate in Chinese rice wine [J]. Liquor Making, 2004, 31(3): 51-53.
- [15] 吴世嘉, 王洪新. 发酵食品中氨基甲酸乙酯的研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2009, 26(9): 15-19.
WU Shijia, WANG Hongxin. Research Advancement of Ethyl Carbamate in Fermented Food [J]. Chemistry & Bioengineering, 2009, 26(9): 15-19.
- [16] MICHELE A, MAURICIO B. Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions [J]. J. Agric. Food Chem, 2001, 49, 2819-2824.
- [17] BRUNO S N F, VAITSMAN D S, KUNIGAMI C N, et al. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits [J]. Food Chemistry, 2007, 104(4): 1345-1352.
- [18] 许宏贤, 段钢. 酒中氨基甲酸乙酯及尿素的研究进展

- [J].酿酒科技,2012,(6):92-95.
XU Hongxian, DUAN Gang. Research Progress in Ethyl Carbamate and Urea in Liquor [J]. Liquor-making Science & Technology, 2012, (6):92-95.
- [19] TA Lonvaud-Funel. Arginine metabolism by wine Lactobacilli isolated from wine [J]. Food Chemistry, 2002, 19: 451-461.
- [20] 罗苏仪,白卫东,赵文红,等.发酵酒中氨基甲酸乙酯形成的代谢途径及控制[J].中国酿造,2013,32(9):9-12.
LUO Sujin, BAI Weidong, ZHAO Wenhong, et al. Investigation on the formation of ethyl carbamate in fermented alcoholic beverages and quality control [J]. China Brewing, 2013, 32(9):9-12.
- [21] 张伟平,赵鑫锐,堵国成,等.酿酒酵母氮代谢物阻遏效应及其对发酵食品安全的影响[J].应用与环境生物学报,2012,18(5):862-872.
ZHANG Weiping, ZHAO Xinrui, DU Guocheng, et al. Nitrogen catabolite repression in saccharo-mycetes cerevisiae and its effect on safety of fermented foods [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(5):862-872.
- [22] 白卫东,沈棚,钱敏.黄酒中氨基甲酸乙酯形成机理及控制方法研究进展[J].中国酿造,2012,(7):6-9.
BAI Weidong, SHEN Peng, QIAN Min. Research advances in formation mechanism and controlling approach of the ethyl carbamate in rice wine [J]. China Brewing, 2012, (7):6-9.
- [23] 林文浩,林峰,周建弟.黄酒中氨基甲酸乙酯和尿素的处理方法与工艺条件[J].酿酒科技,2013,(8):40-43.
LIN Wenhao, LIN Feng, ZHOU Jiandi. Technical conditions of removing ethyl carbamate and urea in yellow rice wine [J]. Liquor-making Science & Technology, 2013, (8):40-43.
- [24] 巫景铭,洪瑞泽,马丽辉,等.黄酒生产中氨基甲酸乙酯的监测与控制[J].酿酒,2011,38(3):4-67.
WU Jingming, HONG Ruize, MA Lihui, et al. Determination and control of ethyl carbamate in the production of rice wine [J]. Liquor Making, 2011, 38(3):4-67.
- [25] 王德良,王晓娟,傅力,等.复合诱变选育低产尿素黄酒酵母[J].酿酒科技,2009,(8):17-24.
WANG Deliang, WANG Xiaojuan, FU Li, et al. Complex mutation breeding of low-urea-yield yellow rice wine yeast [J]. Liquor-making Science & Technology, 2009, (8):17-24.
- [26] 耿予欢,吕芬,黄伟雄,等.黄酒中氨基甲酸乙酯的分析与控制[J].现代食品科技,2013,29(9):2272-2324.
GENG Yuhuan, LÜ Fen, HUANG Weixiong, et al. Analysis and control of ethyl carbamate in Chinese rice wine [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9):2272-2324.
- [27] 熊含鸿,刘嘉飞,曾玩娴.GC/MS测定白兰地中氨基甲酸乙酯[J].酿酒科技,2013,40(4):80-82.
XIONG Hanhong, LIU Jiafei, ZENG Wanxian. Determination of ethyl carbamate in brandy by gas chromatography/mass spectrometry [J]. Liquor-making Science & Technology, 2013, 40(4):80-82.
- [28] SHUGUANG L, GIBB S W. Copper removal from wastewater using spent-grain as biosorbent [J]. Bioresource Technol, 2008, 99(6):1509-1517.
- [29] XU X J, GAO Y H, CAO X J, et al. Derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry for quantification of ethyl carbamate in alcoholic beverages [J]. Sep Sci, 2012, (35):804-810.
- [30] LIU J, XU Y, ZHAO G A. Rapid determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Inst Brew, 2012, (118):217-222.
- [31] 范文来,徐岩.白酒功能因子与品质安全问题[J].酿酒科技,2012,(3):17-22.
FAN Wenlai, XU Yan. Review of functional factors and quality safety factors of baijiu (Chinese Liquor) [J]. Liquor-making Science & Technology, 2012, (3):17-22.
- [32] 梁新红.中国葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2007.
LIANG Xinhong. Study on ethyl carbamate levels in Chinese table wine [D]. Yang Ling: Northwest A&F University, 2007.
- [33] SN 0285-1993.出口酒类中氨基甲酸乙酯残留量检验方法[S].北京:中华人民共和国国家进出口商品检验局,1994.
- [34] DENNIS M J, HOWARTH N, MASSEY R C, et al. Method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages by capillary gas chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1986, 369(1):193-198.
- [35] 刘红丽,张榕杰,卢素格.酒中氨基甲酸乙酯的测定分析[J].中国卫生工程学,2010,9(4):299-300.
LIU Hongli, ZHANG Rongjie, LU Suge. Determination of Ethyl Carbamate in Wines [J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2010, 9(4):299-300.
- [36] JAGERDEO E, DUGAR S, FOSTER G D, et al. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry [J]. J Agric Food Chemistry, 2002, 50:5797-5802.
- [37] 谭文渊,袁东,付大友,等.气相色谱与质谱法(GC-MS)测定白酒中的氨基甲酸乙酯[J].食品研究与开发,2010,31(10):139-141.
TAN Wenyuan, YUAN Dong, FU Dayou, et al. Determination of Ethyl Carbamate in White Liquor by GC-MS [J]. Food Research and Development, 2010, 31(10):139-141.
- [38] 夏强,唐利,梁如,等.影响SPE-GC/MS法检测发酵食

- 品中氨基甲酸乙酯因素的研究[J].食品工业科技, 2014,35(10):66-70.
- XIA Qiang, TANG Li, LIANG Ru, et al. Study on key parameters affecting determination of ethyl carbamate in traditional fermented foods by SPE-GC/MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(10):66-70.
- [39] LACHENMEIER D W, FRANK W, KUBALLA T. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography to the routine analysis of ethyl carbamate in stone-fruit spirits[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(2):108-112.
- [40] 王利平, 刘杨珉, 袁身淑. 固相微萃取气质联用分析黄酒中的氨基甲酸乙酯[J]. 江苏食品与发酵, 2003, 13(4):3-6.
- WANG Liping, LIU Yangmin, YUAN Shenshu. Determination of ethyl carbamate in yellow rice wine by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry[J]. JIANG SU SHI PIN YU FA JIAO, 2003, 13(4):3-6.
- [41] 史斌斌, 徐岩, 范文来. 顶空固相微萃取(HS-SPME)和气相色谱-质谱(GC-MS)联用定量蒸馏酒中氨基甲酸乙酯[J]. 食品工业科技, 2012, 33(14):60-63.
- SHI Binbin, XU Yan, FAN Wenlai. Detection method of ethyl carbamate in distillates by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(14):60-63.
- [42] 邢江涛, 钟其顶, 熊正河, 等. 高效液相色谱-荧光检测器法测定黄酒中尿素含量[J]. 酿酒科技, 2011, (3):104-106.
- XING Jiangtao, ZHONG Qiding, XIONG Zhenghe, et al. Determination of urea content in yellow rice wine by high-performance liquid chromatography combined with fluorescence detection after pre-column derivatisation[J]. Liquor-making Science & Technology, 2011, (3):104-106.
- [43] MELO ABREU S, ARMINDA A, OLIVEIRA B, et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: An interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC/MS method[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382(2):498-503.
- [44] MACHADO A M R, CARDOSO M G, SACZKA A A, et al. Determination of ethyl carbamate in cachaca produced from copper stills by HPLC[J]. Food Chemistry, 2013(138):1233-1238.
- [45] 高年发, 宝菊花, 孙晓雯, 等. HPLC测定白兰地中的氨基甲酸乙酯[J]. 中国酿酒, 2008, (7):84-86.
- GAO Nianfa, BAO Juhua, SUN Xiaowen, et al. Determination of ethyl carbamate(EC) in brandy by HPLC[J]. China brewing, 2008, (7):84-86.
- [46] 陈达炜, 苗虹, 赵文峰, 等. 酒精度对高效液相色谱-荧光法分析白酒中氨基甲酸乙酯含量的影响[J]. 色谱, 2013, 31(12):1206-1210.
- CHEN Dawei, MIAO Hong, ZHAO Wenfeng, et al. Effect of alcoholic strength on the determination of ethyl carbamate in Cheese spirits by high performance liquid chromatography-fluorescence detection[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(12):1206-1210.
- [47] LACHENMEIER D W. Rapid screening for ethyl carbamate in stone-fruit spirits using FTIR spectroscopy and chemometrics[J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382(6):1407-1412.
- [48] 周景文, 堵国成, 陈坚. 发酵食品有害氨(胺)类代谢物形成机制和消除策略[J]. 中国食品学报, 2011, 9(11):8-26.
- ZHOU Jingwen, DU Guocheng, CHEN Jian. Harmful amines(ammonia) metabolites in fermented foods: Formation mechanism and the elimination strategy[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 9(11):8-26.