

DETERMINATION OF DENATONIUM BENZOATE (BITREX) IN ALCOHOLIC PRODUCTS BY LC-APCI-MS

Grzegorz BUSZEWICZ, Krzysztof BAŃKA, Roman MAĐRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

Abstract

The paper presents a procedure of determination of denatonium benzoate (BD, Bitrex) dissolved in ethanol using the LC-APCI-MS technique. In Poland “waste alcohol” can be sold legally but only after denaturation by Bitrex. A special decree of the Ministry of agriculture in 2001 orders addition of BD at a concentration of at least 0.3 g for every 100 litres of alcohol. However, deviations from this norm and illegal distribution of pure alcohol as “disinfection liquid” have been reported. According to industrial norms such liquid should consist of alcohol contaminated by Bitrex, but it often turns out to be alcohol of a very high purity.

Key words

Denatonium benzoate; Denatured alcohol; LC-APCI-MS.

Received 12 December 2005; accepted 30 December 2005

1. Introduction

Denatonium benzoate (BD) was first synthesised in 1958 by chemists from McFarlan Smith (Scotland), while looking for a new local analgesic which would be suitable to replace lidocaine [5]. As a result, a new substance with an extremely bitter taste (hence the trade name Bitrex) and very good solubility in water, alcohol and other solvents, was obtained (Figure 1).

BD is not a very toxic substance (oral LD₅₀ is within range 485–740 mg/kg of body weight for rats) [3]. That is why it can be added to a wide range of domestic chemicals, pesticides, windscreen washer fluids and car antifreeze [3, 5]. But BD's most wide-spread use is as a denaturant: an addition to alcohol, making it unfit for consumption hence the name “denatonium”. According to the manufacturer, addition of Bitrex should comprise between 0.001 and 0.01%. However, producers of ethanol most frequently add it in amounts lower than recommended [2, 4]. Thus, it has become

necessary to elaborate sensitive methods of determination of Bitrex in alcohol. Procedures published so far are based on UV spectrophotometry [1] and HPLC [2, 4], as well as capillary electrophoresis [6] coupled with UV detector, where UV wave lengths of 210 and 214 nm (non-specific for BD) are used for determination of Bitrex (the specific maxima of UV absorption by BD are at wave lengths 261 and 268 nm). This ensures satisfactory limits of detection but low specificity of analysis.

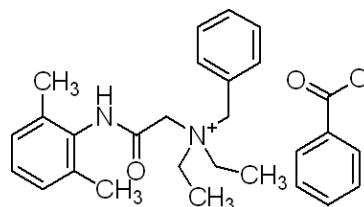


Fig. 1. Chemical structure of Bitrex.

Bitrex was included in the decree of the Polish Ministry of Agriculture of June 18, 2001, as one of 72 permitted substances for the denaturation of alcohol. According to this decree, BD should be added at a concentration of at least 0.3 g/100 l (3 µg/ml), which means that there are products on the market based on waste alcohol (denatured alcohols, solvents, microbicides) containing only Bitrex at an extremely low concentration as a denaturant. This fact has made it necessary to develop a method of BD determination that is not only specific but also very sensitive, in order to allow standard certification of products containing BD.

2. Materials and methodology

2.1. Materials and reagents

8 samples of “disinfection fluid” and 4 alcoholic liquids (denatured alcohol) were analysed. The samples were diluted 1:1 (v:v) and 1:10 (v:v) respectively with acetonitrile and then purified using 13 mm/0,2 µm syringe filters (Alltech, Germany). BD quantitative standards were prepared from 10 mg weighed samples of crystalline denatonium benzoate (Sigma-Aldrich, Germany). Acetonitrile of gradient grade was obtained from Riedel de Haen, Germany, water of HPLC grade purity, formic acid and ammonium formate of MS purity were obtained from Fluka, Switzerland.

2.2. LC-APCI-MS analysis

Analysis was carried out using a Thermo Electron Corporation Surveyor liquid chromatograph (San Jose, USA) fitted with a quaternary pump, autosampler and coupled with an Advantage Max mass spectrometer operating in atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) mode. A Merck Purospher RP-18e (5 µm) 125 × 3 mm column was used. For HPLC, the following gradient was used with solvent A (Acetonitrile) and solvent B (25 mM ammonium-formic buffer, pH 4,5): 0–10 min, A linear 15% to 60%; 10–33 min, A linear 60% to 100%; at a total flow of 0.4 ml/min. A mobile phase with gradient of the following composition was used: ACN (15% to 60% for 10 min and then 60% to 100% for 23 min) – 25 mM ammonium formic buffer, pH 4.5, flow rate 0.4 ml/min. The following parameters for APCI-MS analysis were used: vaporiser temperature: 480 C, gas flow: 65 l/min, shield gas flow – 4 l/min, corona current – 4.5 µA, capillary temperature – 220 C, capillary voltage – 3 V. Detection was performed in full scan mode (m/z range 50–560). Results were collected and interpreted by

X’Calibur software. Characteristic ions were chosen with m/z = 325, 233, 176 and 164. Calibration was performed for an ion with m/z: 325. A Calibration curve was constructed using 7 experimental points (10, 25, 50, 100, 250, 500 and 1000 ng/ml of BD in Acetonitrile solution). Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were determined by checking the signal to noise (S/N) ratio. For LOD, the S/N ratio was 3, and for LOQ, the S/N ratio was 10.

3. Results and discussion

The achieved LOD was 25 ng/ml and LOQ 50 ng/ml. Chromatograms and mass spectra are shown in Figure 2. Linearity was obtained for the calibration range: 50–1000 ng/ml (Figure 3).

The applied chromatographic conditions, i.e. column and buffer, ensured optimal separation. It was also observed that increasing the concentration of the buffer caused a rise in background noise in the chromatogram without visible improvement in the quality of separation. A decrease of concentration caused a drastic change in the shape of peaks, which showed a tailing effect.

BD has a molecular weight of 446, and in the APCI mode is fragmented to form positive ions m/z = 325, 233, 176 and 164. The most intense signal was observed for the ion m/z = 325, and so it was used to perform calibration and quantitation.

The developed method was applied to determination of BD in 8 samples originating from “disinfection fluids” secured for examination by the Police. The presence of BD was not ascertained in any of the samples. Thus, according to Polish standards it was not a disinfection fluid, but pure alcohol¹ distributed in Poland without excise duty. Production of disinfection fluid was thus a “cover” for this fraudulent procedure.

Furthermore, 4 denatured alcohols available at retail outlets were analysed for the presence of BD by the elaborated method. The first should have contained Bitrex, according to the manufacturer’s label, but it did not. The second product, of unknown composition, did not contain BD either. BD was determined in the third product at a concentration of 2 µg/ml (lower than obligatory standards for this type of product) and in the fourth – at 4 µg/ml (i.e. consistent with the norm).

The elaborated method of BD determination in ethanol turned out to be useful in a specific case for evidentiary purposes. It is also a useful instrument in the

¹ With the use of gas chromatography, it was shown that these samples did not contain other volatile substances.

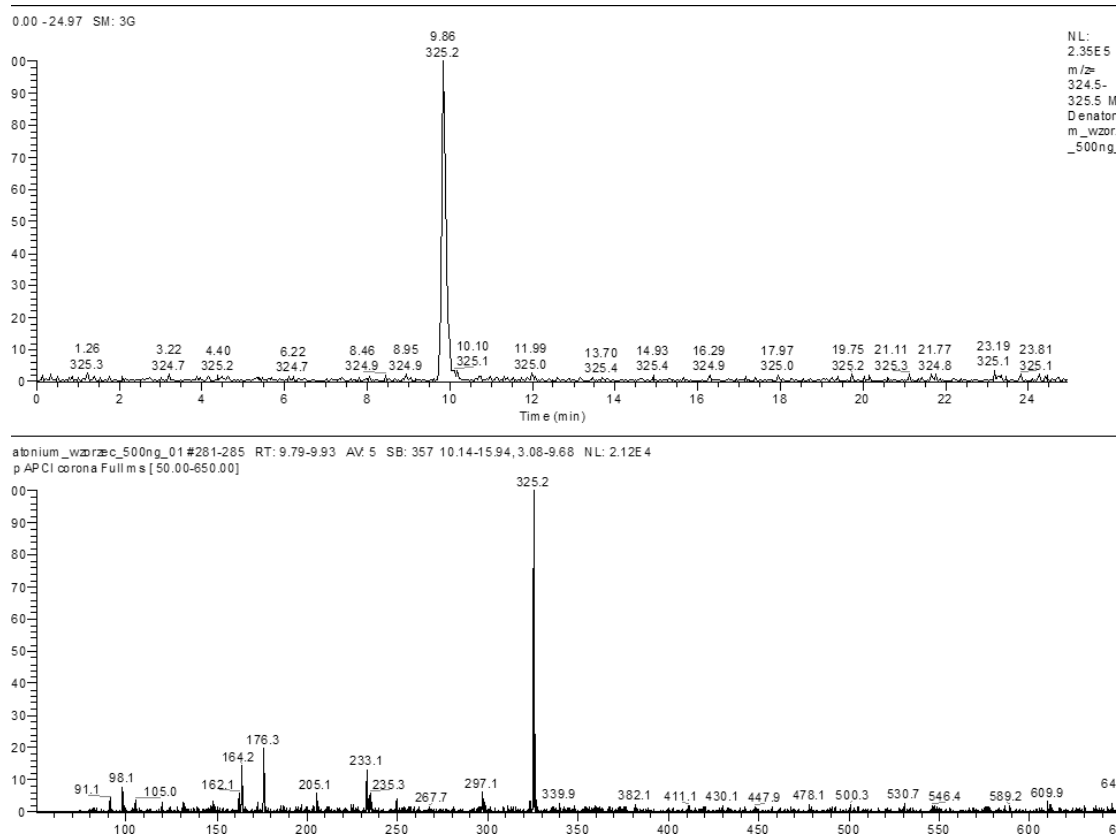


Fig. 2. LC-APCI-MS chromatograms and mass spectra of Bitrex standards, a – 50 ng/ml, b – 500 ng/ml.

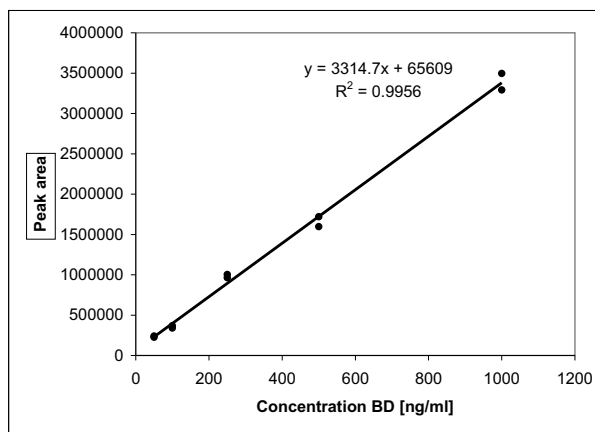


Fig. 3. Calibration curve for determination of BD.

monitoring of products based on waste alcohol before being permitted onto the open market for public sale.

References

1. Bucci R., Balestrieri F., Magri A. D. [et al.], UV-vis spectrophotometric method for quantitation of all the components of Italian general denaturant and its application to check the conformity of alcohol samples, *Talanta* 2006, 68, 781–790.

2. Faulkner A., DeMontigny P., High-performance liquid chromatographic determination of denatonium benzoate in ethanol with 5% polyvinylpyrrolidone, *Journal of Chromatography A* 1995, 715, 189–194.
3. Hansen S., Janssen C., Beasley V., Denatonium benzoate as deterrent to ingestion of toxic substances: toxicity and efficacy, *Veterinary and Human Toxicology* 1993, 35, 234–236.
4. Henderson M., Neumann C., Buhler D. R., Analysis of denatonium benzoate in Oregon consumer products by HPLC, *Chemosphere* 1997, 36, 203–210.
5. http://www.bitrex.com/pages/why_bitrex_frameset.htm
6. Pranaityte B., Daunoravicius Z., Padaravskas A., development and validation of capillary electrophoresis method for the determination of benzoate in denatured alcohol formulations, *Chromatographia* 2004, 60, 353–356.

Corresponding author

Grzegorz Buszewicz
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Akademii Medycznej
im prof. Feliksa Skubiszewskiego
ul. Jaczewskiego 8
20-090 Lublin
e-mail: bushman@asklepios.am.lublin.pl

OZNACZANIE BENZOESANU DENATONIUM (BITREXU) TECHNIKĄ LC-APCI-MS W PREPARATACH SPIRYTUSOWYCH

1. Wstęp

Benzoesan denatonium (BD) został wynaleziony w 1958 r. przez chemików firmy McFarlan Smith (Szkocja) w trakcie poszukiwań analgetyku działającego miejscowo, który mógłby zastąpić lidokainę [5]. W rezultacie otrzymano substancję (rycina 1) o niezwykle gorzkim smaku (stąd komercyjna nazwa Bitrex), bardzo dobrze rozpuszczalną w wodzie, alkoholach oraz innych rozpuszczalnikach.

BD jest mało toksyczny (dla szczura doustnie LD_{50} wynosi ok. 485–740 mg/kg mc.) [3], dzięki czemu można go dodawać do chemicznych preparatów domowego użytku, pestycydów, a także płynów do spryskiwaczy, szyb i odmrażaczy samochodowych [3, 5]. BD rozpowszechnił się jednak najbardziej jako tzw. denaturant, czyli dodatek do alkoholu etylowego stosowany w celu uczynienia go nieprzydatnym do konsumpcji i od tego zastosowania zyskał nazwę chemiczną „denatonium”. Według producenta, dodatek tej substancji powinien wynosić od 0,001 do 0,01%. Producenci etanolu najczęściej stosują go jednak w ilości mniejszej od zalecanej [2, 4]. Konieczne stało się zatem opracowanie metodyk ilościowego oznaczania BD w etanolu. Dotychczas opublikowane procedury bazują na spektrofotometrii UV [1] i HPLC [2, 4] oraz elektroforezie kapilarnej [6] z detekcją UV, w których stosowany jest pomiar absorpcji fali UV o niespecyficznego dla DB długości 210 lub 214 nm (podczas gdy specyficzne maksima absorpcji UV przez DB to 261 i 268 nm), co zapewnia dostateczną oznaczalność BD, ale kosztem specyficzności.

W Polsce, w załączniku do rozporządzenia Ministra Rolnictwa z 18 czerwca 2001 r. Bitrex znalazł się na 14 pozycji wśród 72 substancji dopuszczonych do skażenia spirytusu. Według tego rozporządzenia należy go dodawać w ilości nie mniejszej niż 0,3 g/100 l (tj. 3 µg/ml). Zezwolono zatem, by w obrocie handlowym pojawiły się wyroby sporządzone na bazie spirytusu odpadowego (np. „denaturaty”, rozpuszczalniki i preparaty bakteriobójcze), które według norm zakładowych jako „skażalnik” mogą zawierać wyłącznie BD dodany w bardzo niskim stężeniu. W tej sytuacji opracowanie nie tylko specyficznej, lecz również odpowiednio czułej procedury oznaczania BD stało się koniecznością po to, by możliwa stała się kontrola zgodności tych produktów z normami zakładowymi oraz rozporządzeniem Ministra Rolnictwa.

2. Materiały i metodyka

2.1. Odczynniki i materiały

Przebadano 8 prób „płynu do odkażania” oraz 4 wyroby spirytusowe (denaturaty). Badane płyny rozcieńczono w stosunku 1:1 i 1:10 za pomocą acetonitrylu (ACN) i oczyszczono przy użyciu filtrów strzykawkowych 13 mm/0,2 µm (Alltech, Niemcy). Wzorce ilościowe BD sporządzono z naważki 10 mg krystalicznego benzoesu denatonium (Sigma-Aldrich, Niemcy). Do analizy chromatograficznej użyto acetonitrylu LC-MS (Riedel de Haen, Niemcy) oraz wody do HPLC, kwasu mrówkowego do spektroskopii masowej i mrówczanu amonu do spektroskopii masowej (Fluka, Szwajcaria).

2.2. Analiza LC-APCI-MS

Zastosowano chromatograf cieczowy Surveyor firmy Thermo Electron Corporation (San Jose, Stany Zjednoczone) z pompą czterokolumnową, autosamplerem i spektroskopem masowym Advantage Max wyposażonym w komorę jonizacyjną APCI. Użyto kolumny Merck Purospher RP-18e (5 µm) 125 × 3 mm i fazy ruchomej, gradientowej o składzie: ACN (od 15% do 60% w czasie 10 min, a następnie od 60% do 100% w czasie 23 min) – bufor mrówczanowo-amonowy 25 mM pH 4,5 i przepływie 0,4 ml/min. Zastosowano następujące parametry pracy spektrometru APCI-MS: temperatura odparownika 480 °C, przepływ gazu rozpylającego – 65 l/min, przepływ gazu osłonowego – 4 l/min, prąd igły koronowej – 4,5 µA, temperatura kapilary – 220 °C, napięcie kapilary – 3 V. Detektor pracował w trybie *full scan* w zakresie 50–650 m/z. Wyniki rejestrowano i opracowano przy użyciu pakietu X-Calibur. Chromatogramy monitorowano w kierunku jonów dodatnich m/z = 325, 233, 176 i 164. Kalibrację sporządzono na podstawie intensywności sygnału jonu m/z = 325.

Do określenia granicy wykrywalności (*LOD*), oznaczalności (*LOQ*) oraz sporządzenia krzywej kalibracyjnej użyto roztworów DB w ACN o stężeniach: 10, 25, 50, 100, 250, 500 i 1000 ng/ml. Każdy wzorec analizowano dwukrotnie w warunkach jw. *LOD* określono przy stosunku sygnału do szumu (*S/N*) = 3, zaś *LOQ* przy *S/N* = 10.

3. Wyniki badań z omówieniem

Uzyskano *LOD* = 25 ng/ml i *LOQ* = 50 ng/ml. Chromatogramy wraz z widmami masowymi przedstawiono

na rycinie 2. Uzyskano wysoką liniowość kalibracji w zakresie 50–1000 ng/ml (rycina 3).

Zastosowane warunki chromatograficzne, tj. kolumna i bufor, zapewniły optymalny rozdział chromatograficzny. Zaobserwowano przy tym, że zwiększenie molarności buforu powodowało podwyższenie szumu bez poprawy rozdziału chromatograficznego, zaś jej obniżenie drastycznie zwiększało „ogonowanie” pików chromatograficznych.

BD o masie cząsteczkowej 446 w fazie ruchomej zawierającej kwas mrówkowy lub mrówczan amonu w trybie APCI fragmentuje (po oddzieleniu ujemnego jonu benzoesu $m/z = 121$) na dodatnie jony $m/z = 325, 233, 176$ i 164 , wśród których największą intensywność sygnału zarejestrowano dla $m/z = 325$, w związku z czym użyto go do sporządzenia krzywej kalibracyjnej i oznaczeń ilościowych.

Przy pomocy przedstawionej wyżej metody przebadano 8 dowodów rzeczowych zakwestionowanych przez policję jako „płyn do odkażania” i nie stwierdzono w nich obecności BD. Według normy zakładowej nie był to więc płyn do odkażania. Był to natomiast czysty spirytus¹ dystrybuowany na terenie Polski bez znaku akcyzy. Produkcja płynu do odkażania była zatem tylko „przykrywką” dla tego proceduru.

Ponadto przebadano 4 „denturaty” dostępne w handlu detalicznym. Pierwszy z nich, zgodnie z etykietą producenta, powinien zawierać Bitrex, jednak nie zawierał go wcale, Bitrexu nie zawierał także drugi wyrób o nieujawnionym przez producenta składzie. BD stwierdzono natomiast w trzecim wyrobie w stężeniu $2 \mu\text{g/ml}$ (czyli niższym od nakazanego) i w czwartym – w stężeniu $4 \mu\text{g/ml}$ (tj. zgodnie z normą).

Opracowana metodyka oznaczania BD w etanolu okazała się zatem przydatna w konkretnej sprawie dla potrzeb dowodowych. Stwarza ona ponadto możliwość kontrolowania przez odpowiednie służby produktów na bazie spirytusu odpadowego przed ich dopuszczeniem do obrotu i w handlu detalicznym.

¹ Za pomocą chromatografii gazowej wykazano, że próbki te nie zawierały innych lotnych substancji.