



## DETERMINATION OF DENATONIUM BENZOATE (BITREX) IN DENATURED SPIRIT PREPARATIONS

Dariusz ZUBA, Czesława ŚWIEGODA, Bogumiła BYRSKA, Wojciech LECHOWICZ

*Institute of Forensic Research, Krakow*

### Abstract

The aim of the study was to elaborate a chromatographic method for determination of denatonium benzoate (Bitrex) in spirits intended for industrial purposes as well as in products prepared on the basis of denatured spirit, such as windscreen washers, disinfectants, alcoholic solvents, or barbecue lighting fluid. High-performance liquid chromatography (HPLC) was applied to detection and quantitative analysis of denatonium benzoate in spirit products. Separation was performed on a Chromolith Performance RP-18e (100 × 4.6 mm) column, in gradient conditions, with the use of 0.01% aqueous solution of phosphoric acid and acetonitrile as the eluents. Identification of components was carried out using a spectrophotometric detector with a diode-array matrix (DAD). The presence of denatonium benzoate in spirits was confirmed by mass spectrometry (MS). Liquid samples were introduced directly into the ionisation chamber of the spectrometer. Both positive (ES+) and negative (ES-) ionisation mode were applied. The capillary voltage was 3.0 kV and the CID zone voltage was 15 V. The worked-out procedure of spirits examination for the denatonium benzoate content is straightforward and fast. It enables examination of colourless liquids without preliminary sample preparation, or, possibly, just with centrifugation of the sample. The determined limit of quantitation was 0.3 mg/l, i.e. ten times lower than the minimal amount of denatonium benzoate, which the denatured spirits should contain according to the decree of the Ministry of Agriculture and Rural Development (0.3 g/100 l of 100% alcohol). The above method is used in routine examinations performed at the Institute of Forensic Research.

### Key words

Denatured spirit; Denatonium benzoate; Purification.

*Received 9 December 2005; accepted 30 December 2005*

### 1. Introduction

Denatonium benzoate (Bitrex) is described in the Guinness Book of Records as the bitterest compound known to man. Adding as little as thirty parts of denatonium benzoate to one million parts of a liquid makes it too bitter to be tolerated by most human subjects.

The chemical name of Bitrex is N-benzyl-2-(2,6-dimethylphenylamino)-N,N-diethyl-2-oxoethanaminium benzoate (CAS Registry Number: 3734-33-6). It occurs as white odourless granules of neutral pH (6.5–7.5), with melting point 163–170°C. Denatonium

benzoate is highly soluble in methanol (69.0 g per 100 ml at 20°C), ethanol (33.5), chloroform (33.0) and iso-propanol (10.5), whereas solubility in water is lower (4.5). It was synthesised in 1958 during research on local anaesthetics. Denatonium benzoate is closely related to one such substance – lidocaine. Its chemical structure differs only in the addition of a benzyl group to the amino nitrogen. The chemical structure of denatonium benzoate is shown in Figure 1.

Toxicological data indicate its low toxicity [10]. The determined LD<sub>50</sub> after intragastric application to animals are as follows: LD<sub>50</sub> rat – 820 mg/kg, LD<sub>50</sub> mouse – 865 mg/kg, LD<sub>50</sub> rabbit – 580 mg/kg, LD<sub>50</sub> Guinea

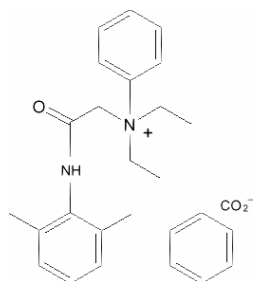


Fig. 1. The chemical structure of denatonium benzoate (Bitrex).

pig – 800 mg/kg, LD<sub>50</sub> rainbow trout – 1000 mg/kg. However, one should remember that there are significant gaps in knowledge in this field, especially relating to chronic toxicity in humans, teratogenicity, and human hypersensitivity potential.

Use of denatonium benzoate is linked to its bitterness. It is used to denature ethyl alcohol that it is not taxed as an alcoholic beverage. In fact, the common name for this chemical, denatonium, alludes to this application. The intensity of its taste, its low toxicity and lack of carcinogenicity make denatonium benzoate an ideal additive to prevent people from ingesting harmful liquids such as detergents, disinfectants, cleaning fluids and garden and horticultural products. Because of the aversion it engenders, denatonium benzoate is increasingly being used as an aversion additive. The addition of denatonium is credited with saving children and animals, who (which) might otherwise drink sweet antifreeze or wiper fluid and get ethylene glycol or methanol poisoning respectively. Other uses include deer repellent, “nail polish” – to discourage nail-biting, paints, coating of electrical cables to prevent rodents from eating the insulation. Very dilute solutions are also used to coat children’s thumbs to prevent thumb sucking. It should be noted that animals are known to have different sensitivity to the effects of denatonium benzoate. Differences in perception of its bitter taste have also been observed in children, adults and elderly persons [14]. The data indicate that addition of denatonium benzoate would be expected to significantly reduce the probability of accidental ingestion [2]. When ingested at 10 ppm by human beings, denatonium benzoate has a bitter, unpleasant taste. It has been proven in studies that the addition of denatonium benzoate to liquid dish detergents reduces the amount of accidental poisonings by children [7]. Oregon was the first state in the United States where mandatory addition of this denaturing agent to automotive products containing at least 10% ethylene glycol or at least 4% methanol was introduced [8]. In 1995, the Toxic Household Products Statute re-

quired the addition of denatonium benzoate at a concentration of 30–50 ppm with the intention of reducing the frequency of serious paediatric intoxications with these products [11]. Since that time many papers showing the preventative action of denatonium benzoate have been published [3, 9, 15].

Denatonium benzoate is a quaternary ammonium, which makes its analysis difficult.

In 1991, a poly(vinyl chloride) matrix membrane ion-selective electrode for the determination of the denatonium ion based on the denatonium salt of tetraphenylborate was described. The response characteristics of the electrode for the denatonium ion and for several other compounds that were quaternary ammonium, were studied. The results of potentiometric measurements of denatonium benzoate content in rapeseed oil in the range of 1–10 ppm agreed to within ±5% of the spiked amounts [10].

The most common method used in practice for its determination in consumer products is high-performance liquid chromatography (HPLC) [5, 8]. Analysis of standard solutions showed a linearity in the range of 1.25 to 50 ppm (producers usually add from 10 to 30 ppm). The eluate from the range corresponding to the recorded peak is collected and the presence of denatonium benzoate is verified by mass spectrometry.

The aim of another study concerning denatonium benzoate was to elaborate a quick method for the isolation and enrichment of this compound from low-solidification fluids applied to cooling of internal-combustion engines (liquids based on ethylene and propylene glycol). Solid phase extraction (SPE) was used for sample preparation and determination was carried out by means of high performance liquid chromatography in reversed phase mode (RP HPLC). Thanks to optimisation of the sample preparation method, high recoveries (about 90%) as well as reproducibility of quantitative and qualitative results of determined analyte concentration ( $RSD = \pm 1\%$ ) were obtained [6].

The capillary electrophoresis (CE) technique has also been applied to studies. Optimised separation was carried out in 0.025 mol/l Tris-phosphate electrolyte (pH 7.0) using direct UV detection at 214 nm. Calibration was linear in the range 2–50 mg/l. The detection limit determined for a 10 s electrokinetic (5 kV) injection was 0.45 mg/l (3/N). The method was applied to the determination of Bitrex in various denatured alcohol formulations and the results were comparable with those obtained by the HPLC method [13].

The currently developed tandem technique, i.e. mass spectroscopy with atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI-MS) coupled with direct flow injection, was applied to the determination of Bitrex in

ethanol. Compounds were identified on the basis of their total-ion chromatograms collected in the range of  $m/z$  50–500. Quantitative analysis was also performed using selected-ion  $m/z$  325 for Bitrex. Operating conditions were optimised for soft ionisation (positive ion-mode) with fragmentation limited to that necessary for analyte identification. The calibration curve was rectilinear in the concentration range 2–30 g/ml, the measurement precision (*RSD*) was 11.5% and detection limit was 0.017 g/ml. The method allowed simultaneous quantification with high sensitivity. The lack of any sample pre-treatment and the use of flow-injection analysis meant that the procedure was more straightforward and rapid than previously reported methods [1].

The aim of the study presented in this paper was to develop a simple procedure of spirits examination using chromatographic techniques in order to determine the denatonium benzoate content.

## 2. Materials and methods

When developing the method of denatonium benzoate determination, a standard of this substance manufactured by Sigma-Aldrich was applied. Standard solutions of Bitrex were prepared by weighing an appropriate amount of denatonium benzoate and dissolving in rectified spirit (Polmos Warsaw). The accuracy of the concentration in the prepared solution was assessed in inter-laboratory examinations.

The worked out method was also applied to the analysis of evidential material. Samples of ethyl alcohol seized in 2005 and delivered to the Alcohol and Drugs Section of the Institute of Forensic Research were used for this purpose. The main group comprised alcoholic beverages seized in restaurants and from private persons. Moreover, alcohol originating from plants dealing with its processing was also studied.

In order to determine the content of denatonium benzoate in examined liquids, high-performance liquid chromatography (HPLC) was applied. Examinations were performed by means of a LaChrom (Merck/Hitachi) instrument, which was equipped with a diode-array detector (DAD). Samples of colourless alcohols were analysed directly, or analysed after centrifugation. An aqueous solution of 85% phosphoric acid at a concentration of 0.1 ml/l (phase A) and acetonitrile (phase B) were used as eluents. Chromatographic separation was performed on a Chromolith Performance RP-18e (100 × 4.6 mm) monolithic column, in standard gradient conditions: 0 min – 0% of phase A/100% of phase B, 20 min – 100% of phase

A/0 % of phase B, 21 min – 100% of phase A/0 % of phase B and 5 min stabilisation in these conditions. Measurements of denatonium benzoate concentration were carried out at two wavelengths: 205 nm and 230 nm.

“Validation Manager” software created by Merck/Eurolab was applied when calculating validation parameters.

Mass spectrometry (MS) was used for confirmation of the presence of denatonium benzoate. A Quattro Micro API mass spectrometer manufactured by Micromass was applied in the study. Liquid samples were introduced directly into the ionisation chamber of the spectrometer with a flow velocity of 10  $\mu$ l/min. Both the positive (ES+) and negative (ES-) ionisation mode were used. The capillary voltage was 3.0 kV and the CID zone voltage was 15 V. Drying gas was delivered with a velocity of 600 l/h at 300°C. The temperature of the ions' source was 100°C. Ion mass range  $m/z$  = 25–400 was monitored.

## 3. Results and discussion

Denatonium benzoate is a denaturing agent for ethyl alcohol, listed in the decree of the Ministry of Agriculture and Rural Development of 11 August 2003 concerning agents permitted to denature ethyl alcohol [16]. Its addition does not affect the basic physicochemical properties of ethyl alcohol, because the amount of denatonium benzoate that should be added according to the above mentioned decree is small and amounts to 0.3 g per 100 l of 100% ethyl alcohol. Bitrex can also be added in the form of 20% alcoholic solution.

Denatonium benzoate is a chemical of relatively high molecular mass. Analysing its structure, one may observe that it is a quaternary salt containing chromophoric groups. Therefore, the method of choice for determination of denatonium benzoate is high-performance liquid chromatography (HPLC).

Preliminary studies were performed with the use of a classical LiChroCART (125 × 4 mm) chromatographic column filled with Lichrospher 60 RP – select B, but significantly better results were obtained using a Chromolith Performance RP-18e (100 × 4.6 mm) monolithic column. The use of a monolithic column allowed us to obtain a significantly higher sensitivity and selectivity of determinations and significantly influenced the range of applications of the worked out method.

The concentration of denatonium benzoate defined in the decree of the Ministry of Agriculture and Rural

Development is equivalent to a concentration of 3 mg/l. Because chromatographic peaks of a relatively high intensity were obtained in the preliminary examination of denatonium benzoate standard solution at this concentration, it was decided to maximally simplify the procedure of sample preparation for analysis. Samples of ethyl alcohol were placed directly in measurement vials, or, in the situation where the liquids were not completely transparent, they were centrifuged. A chromatogram of standard solution of denatonium benzoate (Bitrex) at a concentration of 3.0 mg/l is shown in Figure 2.

The conditions used in chromatographic separation are described in the "Materials and Methods" section.

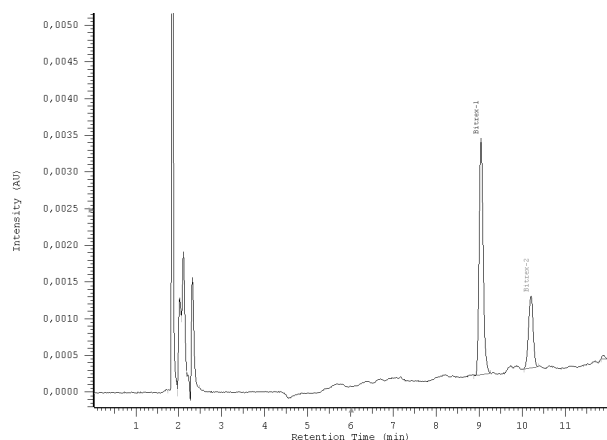


Fig. 2. Chromatogram of standard solution of denatonium benzoate (Bitrex) at a concentration of 3.0 mg/l.

During analysis of standard solutions of denatonium benzoate in the mentioned conditions, two chromatographic peaks were obtained. They probably correspond to two out of three possible forms of this compound occurring in aqueous-alcoholic solutions, that is: undissociated forms of denatonium benzoate (DB), benzoate ion ( $B^-$ ) and denatonium ion ( $D^+$ ). The chromatographic peak of retention time 9.05 min had two absorption maximums, about 205 nm and 230 nm, whereas the peak of retention time 10.30 min – only one maximum (about 205 nm).

The occurrence of two or more chromatographic peaks originating from the same substance is not a frequent occurrence, but it is possible in the case of substances that undergo dissociation. Quaternary salts are included in this group. In accordance with basic chemical laws, the concentrations of dissociated ions and undissociated forms are strictly correlated with the initial compound concentration, and therefore each of the obtained chromatographic peaks can be used as the basis for quantitative analysis. The occurrence of more

than one peak originating from the same substance allows us to increase the precision of determinations.

Because it was impossible to determine on the basis of the obtained spectra which chromatographic peak corresponds to the particular form of denatonium benzoate present in the solution, analysis of a standard solution of benzoic acid was carried out. A peak of retention time 9.05 min and two absorption maximums (about 205 nm and 230 nm) were obtained on the chromatogram of this compound. Comparison of this chromatogram with the denatonium benzoate chromatogram indicated that the first of the peaks originates from benzoate ions. Thus, analysis of denatonium benzoate content in alcoholic beverages performed on the basis of the first of the peaks was an indirect analysis by determination of the content of benzoate ions. The use of indirect methods is a frequent practice in toxicological laboratories. For example, determination of alcohol in blood by means of the ADH enzymatic method can be included among such determinations. In this method, the concentration of alcohol is proportional to the reduced form of NADH, which is formed as the result of the reaction of alcohol with  $NAD^+$  in the presence of the enzyme ADH. NADH has a specific absorption at a wavelength of 340 nm. Because the authors did not possess a standard of any other salt containing denatonium ions, it was impossible to determine if the chromatographic peak of retention time 10.30 min originates from denatonium cations or from undissociated molecules of denatonium benzoate. Nevertheless, one can assume that the signal strength is proportional to the amount of denatonium ions in the solution.

Standard solutions of denatonium benzoate in rectified spirit that did not contain this compound were prepared in order to make the calibration curve. The concentration of Bitrex in particular solutions was: 0.0, 1.5, 3.0, 6.0, 9.0 and 12.0 mg/l. The accuracy of the values for the prepared solutions was assessed within the framework of inter-laboratory analyses concerning alcohol solution denatured by Bitrex at 3.0 mg/l. The result was consistent with expectations ( $2.9 \pm 0.3$  mg/l). Calibration curves were prepared for both chromatographic peaks. For the peak of retention time 9.05 min, analyses were performed at wavelength 230 nm, whereas for the peak of retention time 10.30 min – at 205 nm. For both peaks, a linear relationship between their areas and the concentration of Bitrex in the tested range (1.5–12 mg/l) was obtained. Values of the correlation coefficient were in both cases higher than 0.999. Calibration curves are shown in Figure 3.

As can be seen from Figure 3, a higher sensitivity, which can be determined by the slope of the calibra-

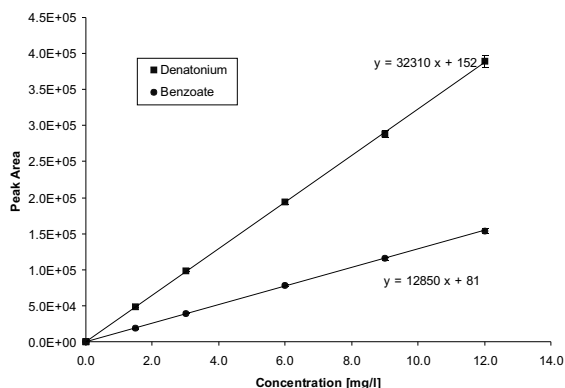


Fig. 3. Calibration curves for denatonium benzoate in alcoholic beverages.

tion curve, is obtained for the peak corresponding to denatonium ions. Next, limits of determination (*LOD*) and limits of quantitation (*LOQ*) were also determined on the basis of calibration curves. They were independent of the peak used for calculations and were: 0.1 mg/l and 0.3 mg/l, respectively. Similar values of *LOD* and *LOQ* calculated on the basis of peaks, for which different sensitivities were obtained, might seem to be odd. The explanation for this phenomenon is the higher value of random error (lower precision) for measurements of a peak of higher sensitivity. The obtained value of *LOQ* is ten times lower than the minimal amount of Bitrex that should be added in order to denature spirit. Therefore, it can be stated that the developed method can be used for examination of such liquids.

The use of two chromatographic peaks to determine the concentration of a compound allows better estimation (two results are obtained during one analysis). The error of denatonium benzoate determination in the worked out measurement range was below 2%.

The presence of denatonium benzoate in spirit preparations was confirmed by means of mass spectrometry. Analyses were performed under the conditions mentioned in the "Materials and Methods" section.

Measurements were performed both in positive (*ES*<sup>+</sup>) and negative (*ES*<sup>-</sup>) ionisation mode. During analyses of denatured spirits, a mass ion corresponding to the molecular mass of the compound, *m/z* = 446, was not detected in any of the ionisation modes (in the preliminary study the mass range *m/z* = 25–500 was applied). In positive ionisation mode, the most characteristic mass ion turned out to be an ion at *m/z* ratio = 325, whose mass corresponds to denatonium ion. Other mass ions of relatively high intensity were ions at *m/z* = 144 and 135. During analysis in negative ionisation mode, the presence of mass ion at *m/z* ra-

tio = 121, which corresponds to the mass of the benzoate ion, was detected. Moreover, a second characteristic ion at *m/z* = 89 was formed. Mass spectra of a standard solution of alcohol denatured by Bitrex at a concentration of 3 mg/l are shown in Figure 4.

The worked out procedure was applied to determination of the denatonium benzoate concentration in spirit preparations. These included both consumer alcoholic beverages seized in restaurants and pubs and from private persons and industrial products prepared on the basis of denatured alcohol.

The obtained results were surprising. Consistency between concentrations determined on the basis of the benzoate ion and the second peak, whose signal was dependent on the concentration of denatonium ions in solution, was achieved for only two of the examined samples of denatured spirit. In most cases, only one peak corresponding to benzoate ions was obtained. Further analyses were carried out on consumer alcoholic beverages in the possession of the Alcohol and Drug Section, and in none of them was the presence of either benzoate ions or the analytical signal dependent on the concentration of denatonium ions detected. Standard solutions of Bitrex stored for several weeks were also subjected to analysis and a decrease in concentration was not detected of any form of this compound. Analysis by means of mass spectrometry confirmed these results. For most of the samples in positive ionisation mode, an ion at *m/z* = 325, that is originating from the denatonium ion, was not detected, whereas an additional mass peak at *m/z* ratio = 360 appeared. At the same time, the mass spectra in negative ionisation mode were transformed and additional mass peaks, whose configuration could indicate the presence of chloride derivatives in the solution, appeared. The above results and operational data obtained from the police allowed us to accept the hypothesis that persons who introduce products prepared on the basis of denatured spirit onto the illegal market, remove the Bitrex present in such liquids. This is accomplished most often by addition of sodium hypochlorite. The mass spectra of a standard solution of alcohol denatured by Bitrex at a concentration of 3 mg/l, with addition of sodium hypochlorite in the amount of 50 µl/ml, are shown in Figure 5.

As can be seen from Figure 5, the mass spectra of denatured spirit, both in positive and negative ionisation mode, undergo big changes after addition of sodium hypochlorite. The issue of the influence of sodium hypochlorite on the content of denatonium benzoate is the subject of another paper by the authors [16].

Disappearance of the peak whose signal depends on the concentration of denatonium in a sample indi-

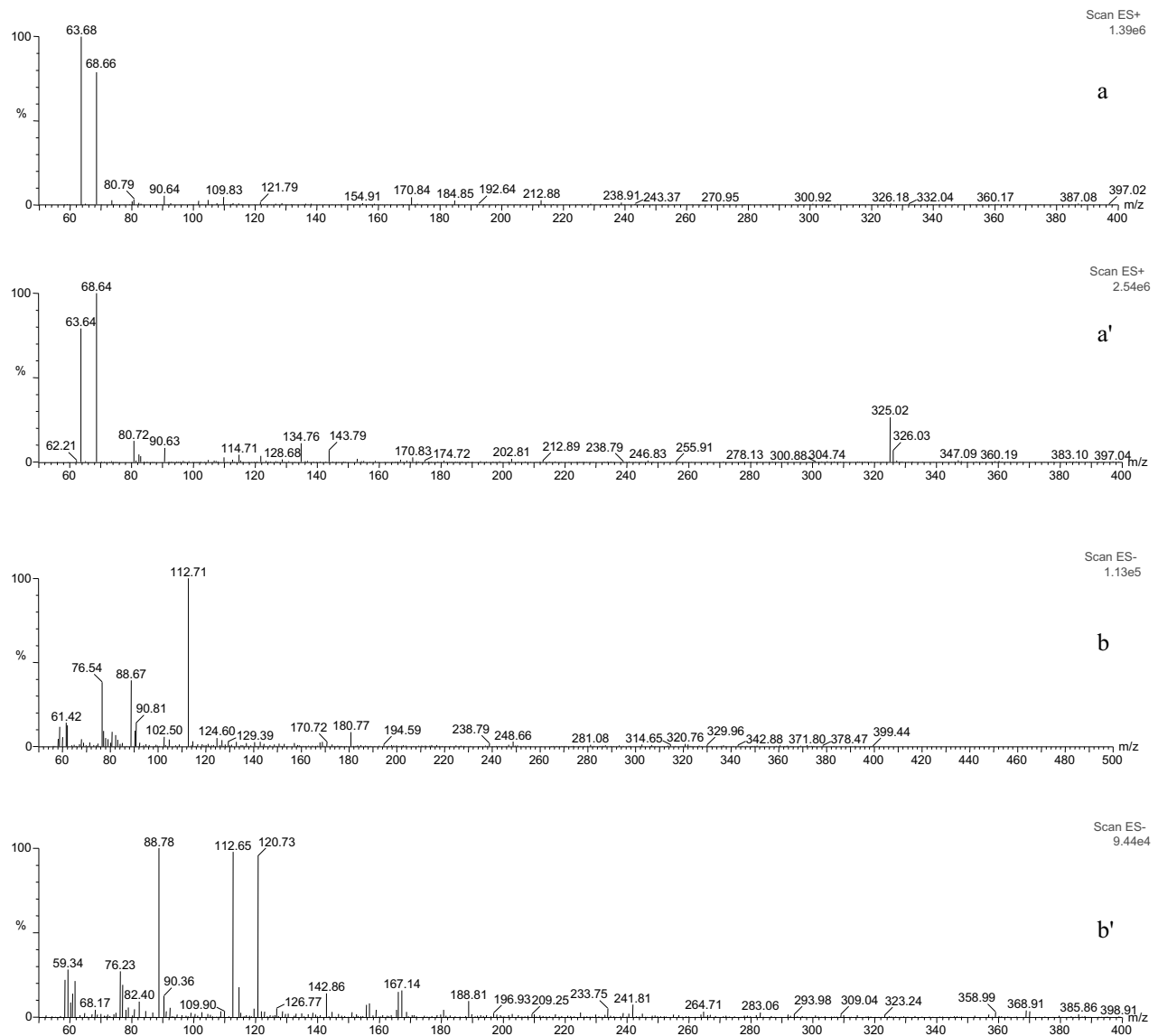


Fig. 4. The mass spectra of rectified spirit (a – positive ionisation mode, b – negative ionisation mode) and a standard solution of spirit denatured by denatonium benzoate at a concentration of 3 mg/l (a' – positive ionisation mode, b' – negative ionisation mode).

icates that these ions have been removed from the solution. As a consequence, one should state that the concentration of Bitrex is below the limit of detection of the method. Calculations performed on the basis of the peak corresponding to the concentration of benzoate ions would lead to different conclusions, because these ions are still present in the solution.

Thus, if the aim of the analysis is to determine the concentration of Bitrex in the solution using the developed method, the calculation has to be based on the peak of retention time 10.30 min, whose concentration is proportional to the content of denatonium ions in the solution. A comparison of the concentration obtained

in such a way with the concentration determined on the basis of benzoate ions content may indicate that attempts to remove Bitrex from the solution were made. These results can be confirmed by mass spectrometry.

20% technical solutions of Bitrex used to denature alcohol were also analysed at the Institute of Forensic Research. The results were also surprising. It turned out that these solutions contained significantly smaller amounts of this compound than declared. Bitrex concentration determined by means of the HPLC method in such liquids amounted to 10–12%. Liquids used for denaturation are examined before their use, but the analytical methods applied for this purpose are highly

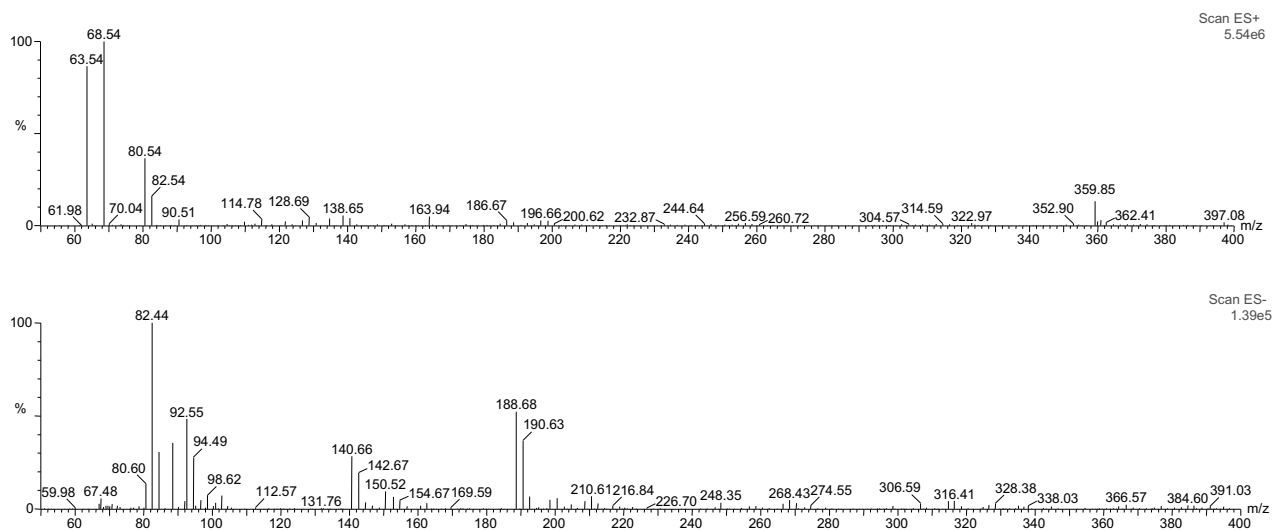


Fig. 5. Mass spectra of spirit denatured by denatonium benzoate with the addition of sodium hypochlorite.

non-selective (measurement of density is used most often). Thus, it is possible that the lower content of Bitrex often detected in the examined liquids results from its lower content in the denaturing fluid.

#### 4. Conclusions

The worked out HPLC method allows determination of denatonium benzoate (Bitrex) concentration by determination of benzoate ions as well as denatonium ions or molecules of denatonium benzoate. Analysis of the content of these compounds allows us to establish whether the examined liquid contains Bitrex, or whether the liquid was denatured by Bitrex and then this agent was removed.

Mass spectrometry can be used for confirmation of the presence of denatonium benzoate in denatured spirits. It also often allows us to assess whether the evidential liquid contains compounds formed as the result of the reaction between denatonium benzoate and an oxidising agent, e.g. sodium hypochlorite.

#### References:

1. Alvarez-Piñeiro M. E., López De Alda-Villaizán M. J., Paseiro-Losada P. [et al.], Determination of the alcohol denaturants denatonium benzoate (Bitrex) and diethyl phthalate by direct flow injection APCI-MS analysis, *Journal of High Resolution Chromatography* 1997, 20, 321–324.
2. Berning C. K., Griffith J. F., Wild J. E., Research on the effectiveness of denatonium benzoate as a deterrent to liquid detergent ingestion by children, *Fundamentals of Applied Toxicology* 1982, 2, 44–48.
3. Carnahan R. M., Kutscher E. C., Obritsch M. D. [et al.], Acute ethanol intoxication after consumption of hair-spray, *Pharmacotherapy* 2005, 25, 1646–1650.
4. Dziennik Ustaw z dnia 11 sierpnia 2003 r., nr 163, poz. 1582.
5. Faulkner A., DeMontigny P., High-performance liquid chromatographic determination of denatonium benzoate in ethanol with 5% polyvinylpyrrolidone, *Journal of Chromatography A* 1995, 715, 189.
6. Gadzała-Kopciuch R. M., Buszewska T., Buszewski B., Isolation and determination of denatonium benzoate in antifreezing agents by solid phase extraction and HPLC, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2000, 23, 3133–3142.
7. Hansen S. R., Janssen C., Beasley V. R., Denatonium benzoate as a deterrent to ingestion of toxic substances: toxicity and efficacy, *Veterinary and Human Toxicology* 1993, 35, 234–236.
8. Henderson M. C., Neumann C. M., Buhler D. R., Analysis of denatonium benzoate in Oregon consumer products by HPLC, *Chemosphere* 1998, 36, 203–210.
9. Jackson M. H., Payne H. A., Bittering agents: their potential application in reducing ingestions of engine coolants and windshield wash, *Veterinary and Human Toxicology* 1995, 37, 323–326.
10. Klein-Schwartz W., Denatonium benzoate: review of efficacy and safety, *Veterinary and Human Toxicology* 1991, 33, 545–547.
11. Mullins M. E., Zane Horowitz B., Was it necessary to add Bitrex (denatonium benzoate) to automotive products?, *Veterinary and Human Toxicology* 2004, 46, 150–152.
12. Nambiar O. G., Gosavi K., Ravindranathan T., Plastic membrane ion-selective electrode for the determination

- of denatonium benzoate (Bitrex), *Analyst* 1991, 116, 1011–1012.
13. Pranaitytė B., Daunoravičius Ž., Padaruskas A., Development and validation of a capillary electrophoresis method for the determination of denatonium benzoate in denaturated alcohol formulations, *Chromatographia* 2004, 60, 353–357.
  14. Schiffman S. S., Gatlin L. A., Frey A. E. [et al.], Taste perception of bitter compounds in young and elderly persons: relation to lipophilicity of bitter compounds, *Neurobiology of Aging* 1994, 15, 743–750.
  15. Sibert J. R., Frude N., Bittering agents in the prevention of accidental poisoning: children's reactions to denatonium benzoate (Bitrex), *Archives of Emergency Medicine* 1991, 8, 1–7.
  16. Zuba D., Świegoda C., Byrska B. [et al.], Assessment of the effectiveness of denatonium benzoate (Bitrex) removal from denaturated spirit preparations using sodium hypochlorite, *Problems of Forensic Sciences* 2005, 63, 289–299.

---

**Corresponding author**

Dariusz Zuba  
Instytut Ekspertyz Sądowych  
ul. Westerplatte 9  
31-033 Kraków  
e-mail: dzuba@ies.krakow.pl

---



## OZNACZANIE BENZOESANU DENATONIUM (BITREXU) W SKAŻONYCH WYROBACH SPIRYTUSOWYCH

### 1. Wprowadzenie

Benzoesan denatonium (Bitrex) został odnotowany w Księdze rekordów Guinnessa jako najbardziej gorzka substancja znana człowiekowi. Dodatek 0,000030 części objętościowych benzoesanu denatonium powoduje, że płyn jest zbyt gorzki dla większości osób, żeby mógł być przez nie spożyty.

Chemiczna nazwa Bitrexu to benzoesan N-benzylo-2-(2,6-dimetylofenyloamino)-N,N-dietylo-2-oksoetanolaminy (numer rejestru CAS: 3734-33-6). Występuje on w postaci bezwonnych granulek, ma odczyn obojętny (pH 6,5–7,5), a jego temperatura topnienia wynosi 163–170°C. Benzoesan denatonium jest dobrze rozpuszczalny w metanolu (69,0 g na 100 ml w temperaturze 20°C), etanolu (33,5), chloroformie (33,0) i izo-propanolu (10,5), natomiast jego rozpuszczalność w wodzie jest niższa (4,5). Został zsyntezowany w 1958 roku podczas badań nad środkami służącymi do znieczulania miejscowego. Benzoesan denatonium jest zbliżony budową chemiczną do jednego z takich środków – lidokainy; różni się tylko obecnością grupy benzylowej przy azocie grupy aminowej. Chemiczna struktura benzoesanu denatonium została przedstawiona na rycinie 1.

Dane toksykologiczne wskazują na niską toksyczność tego związku [10]. Wyznaczone wartości LD<sub>50</sub> po podaniu dożołądkowym dawki śmiertelnej dla zwierząt były następujące: u szczura – 820 mg/kg, u myszy – 865 mg/kg, u królika – 580 mg/kg, u świnki morskiej – 800 mg/kg, u pstrąga tęczowego – 1000 mg/kg, u krewetek – 400 mg/kg. Należy jednak pamiętać, że w wielu aspektach wiedza nie jest wystarczająco duża, szczególnie w odniesieniu do chronicznej toksyczności, teratogenności oraz zjawiska nadwrażliwości u ludzi.

Zastosowanie benzoesanu denatonium jest związane z jego gorzkim smakiem. Używa się go do skażania alkoholu etylowego, za który nie jest pobierana akcyza tak jak dla napojów alkoholowych. W rzeczywistości główny człon nazwy tego związku pochodzi od angielskiego słowa „denaturated”, czyli skażony (stąd też polska nazwa „denaturat”). Intensywność jego smaku, mała toksyczność oraz brak działania rakotwórczego powodują, że jest idealnym dodatkiem zapobiegającym przypadkowemu przyjmowaniu przez ludzi takich płynów, jak detergenty, środki dezynfekujące, płyny czyszczące, środki wykorzystywane w ogródkach domowych czy produkty ogrodnicze. Ze względu na awersję, jaką wywołuje, benzoesan denatonium jest coraz częściej w tym celu wykorzystywany. Dodatek benzoesanu denatonium jest stosowany w celu ochrony dzieci i zwierząt, które mogą

spożywać środki odmrażające o słodkim smaku czy płyny do spryskiwaczy, co może doprowadzić do zatrucia glikolem etylenowym lub metanolem. Bitrex zawierają również środki odstraszające jelenie, lakiery do paznokci zniechęcające do ich gryzienia, farby, a także powłoki kabli elektrycznych w celu ich ochrony przed gryzoniami. Bardzo rozcieńczone roztwory są również stosowane w celu zapobieżenia ssaniu kciuków przez dzieci. Należy zaznaczyć, że zwierzęta reagują z różną czułością na benzoesan denatonium. Zauważono także różnice w percepcji jego gorzkiego smaku u dzieci, dorosłych i osób starszych [14]. Dane wskazują, że dodatek benzoesanu denatonium zdaje się w znaczący sposób zmniejszać prawdopodobieństwo przypadkowego jego spożycia [2]. Po przyjęciu przez człowieka 10 ppm benzoesanu denatonium występuje w ustach skrajnie gorzki, nieprzyjemny smak. W badaniach udowodniono, że dodatek benzoesanu denatonium do płynów do mycia naczyń wpływa na liczbę przypadkowych zatruc u dzieci [7]. Oregon był pierwszym stanem amerykańskim, który wprowadził konieczność dodawania tego środka do stosowanych w samochodach produktów zawierających co najmniej 10% glikolu etylenowego lub co najmniej 4% metanolu [8]. W 1995 roku rozporządzenie dotyczące toksyczności produktów gospodarstwa domowego wymagało dodatku benzoesanu denatonium w stężeniu 30–50 ppm w celu zmniejszenia częstości poważnych zatruc dzieci tymi produktami [11]. Od tego czasu opublikowano wiele prac wykazujących prewencyjne działanie omawianego środka [3, 9, 15].

Benzoesan denatonium jest aminą czwartorzędową, co powoduje, że jego analiza nie jest prosta. W 1991 roku opisano metodę oznaczania jonu denatonium w oparciu o sól czterofenyloboranową z wykorzystaniem membranowej elektrody jonoselektywnej z matrycą poli(winyl-ochlorkową). Badana była charakterystyka sygnału elektrody dla jonu denatonium i kilku innych związków będących aminami czwartorzędowymi. Wyniki pomiarów potencjometrycznych zawartości benzoesanu denatonium w oleju rzepakowym w zakresie 1–10 ppm było zgodne w ±5% ze wstrzykniętą ilością tego związku [12]. Metodą stosowaną najczęściej w praktyce do jego oznaczenia w produktach konsumpcyjnych jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [5, 8]. Analiza roztworów wzorcowych wskazała na liniowość w zakresie 1,25–50 ppm (producenci zwykle dodają 10–30 ppm). Eluat z zakresu odpowiadającego zarejestrowanemu pikowi był zbierany i obecność benzoesanu denatonium była zweryfikowana metodą spektrometrii masowej.

Celem innej pracy [6] dotyczącej benzoesu denatonium było opracowanie szybkiej metody izolacji i wzbogacenia tego związku z niskozamarzających płynów stosowanych do chłodzenia silników (płynów sporządzonych na bazie glikolu etylenowego i propylenowego). Do przygotowania próbki wykorzystano ekstrakcję do fazy stałej (SPE), a oznaczenie prowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP HPLC). Dzięki optymalizacji metody przygotowania próbki uzyskano wysokie odzyski (około 90%) oraz powtarzalność jakościowych i ilościowych wyników uzyskanego stężenia analitu ( $RSD = \pm 1\%$ ).

Do badań wykorzystano również technikę elektrofozy kapilarnej (CE). Zoptymalizowany rozdział był prowadzony w 0,025 mol/l elektrolicie Tris-fosforanowym (pH 7,0) z zastosowaniem bezpośredniej detekcji w zakresie UV przy 214 nm. Kalibracja była liniowa w zakresie 2–50 mg/l. Granica wykrywalności wyznaczona dla 10 s elektrokinetycznego (5 kV) nastrzyku wynosiła 0,45 mg/l (3/N). Metoda została zastosowana do oznaczania bitreksu w różnych skażonych produktach alkoholowych, a jej wyniki były porównywalne do uzyskanych metodą HPLC [13].

Obecnie opracowano metodę tandemową, tj. spektroskopię mas z jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym sprzężoną z analizą przepływowo-wstrzykową do oznaczania Bitreksu w etanolu. Związki zidentyfikowano na podstawie ich widm masowych zbieranych w zakresie  $m/z$  50–500. Równocześnie przeprowadzano analizę ilościową przy wybranym jonie  $m/z$  325 dla Bitreksu. Warunki pracy zostały zoptymalizowane dla miękkiej jonizacji (w jonizacji dodatniej) z fragmentacją prowadzoną jedynie w zakresie koniecznym do identyfikacji analitu. Krzywa kalibracyjna była prostoliniowa w zakresie stężeń 2–30 g/ml, precyzja ( $RSD$ ) wynosiła 11,5%, a granica wykrywalności 0,017 g/ml. Metoda zapewniała równoczesną analizę jakościową i ilościową prowadzoną z wysoką czułością. Brak jakiegokolwiek przygotowania próbki oraz zastosowanie analizy przepływowo-wstrzykowej oznaczały, że procedura była prostsza i szybsza niż opisane poprzednio [1].

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było opracowanie prostej procedury badania wyrobów spirytusowych pod kątem zawartości benzoesu denatonium z wykorzystaniem technik chromatograficznych.

## 2. Materiał i metody

Przy opracowaniu metody oznaczania benzoesu denatonium wykorzystano wzorec tej substancji zakupiony w firmie Sigma Aldrich. Roztwory wzorcowe Bitreksu sporządzano poprzez odważenie odpowiedniej ilości benzoesu denatonium i rozcieńczenie spirytusem rektyfikowanym (Polmos Warszawa). Dokładność stę-

żenia w sporządzonym roztworze została oceniona w ramach porównań międzylaboratoryjnych.

Opracowaną metodę zastosowano do badania materiału dowodowego. Wykorzystano w tym celu próbki alkoholu etylowego zabezpieczone w 2005 roku i przekazane do badań w Pracowni Badania Alkoholu i Narkotyków Instytutu Ekspertyz Sądowych. Główną grupę stanowiły napoje alkoholowe zakwestionowane w restauracjach lub u osób prywatnych. Ponadto badano alkohol pochodzący z zakładów zajmujących się jego przetwórstwem.

W celu wyznaczenia zawartości benzoesu denatonium w badanych płynach opracowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Badania przeprowadzono za pomocą urządzenia LaChrom (Merck/Hitachi) wyposażonego w detektor szeregu diod (DAD). Próbki bezbarwnych alkoholi były poddawane analizie bezpośrednio bądź po odwirowaniu. Jako eluenty zastosowano wodny roztwór 85% kwasu fosforowego o stężeniu 0,1 ml/l (faza A) oraz acetonitryl (faza B). Rozdział chromatograficzny był prowadzony na kolumnie monolitycznej Chromolith Performance RP-18e (100 4,6 mm) w standardowych warunkach gradientowych: 0 min – 0% fazy A/100% fazy B, 20 min – 100% fazy A/0% fazy B, 21 min – 100% fazy A/0 % fazy B i 5 min stabilizacji w tych warunkach. Pomiar stężenia benzoesu denatonium były wykonywane przy dwóch długościach fali: 205 nm i 230 nm.

Przy obliczaniu parametrów walidacyjnych wykorzystano program komputerowy "Validation Manager" firmy Merck/Eurolab.

Do potwierdzenia obecności benzoesu denatonium wykorzystano metodę spektrometrii mas (MS). W badaniach zastosowano spektrometr masowy Quattro Micro API firmy Micromass. Próbki płynu były wprowadzane bezpośrednio do komory jonizacyjnej spektrometru z szybkością przepływu 10  $\mu$ l/min. Stosowano zarówno dodatnią (ES+), jak i ujemną (ES-) jonizację. Napięcie kapilary wynosiło 3,0 kV, natomiast napięcie w strefie CID wynosiło 15 V. Gaz osuszający podawany był z szybkością 600 l/h w temperaturze 300 C. Temperatura źródła jonów wynosiła 100 C. Monitorowano zakres mas jonowych  $m/z = 25$ –400.

## 3. Wyniki i ich omówienie

Benzoesan denatonium jest środkiem skażającym alkohol etylowy wymienionym w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 11 sierpnia 2003 r. w sprawie środków dopuszczonych do skażania alkoholu etylowego [4]. Jego dodatek nie wpływa na podstawowe własności fizykochemiczne alkoholu etylowego, ponieważ ilość benzoesu denatonium, jaką należy dodać zgodnie z ww. rozporządzeniem, jest niewielka i wynosi

0,3 g na 100 l 100% alkoholu etylowego. Bitrex może być dodany również w postaci 20% roztworu alkoholowego.

Benzoesan denatonium jest związkiem chemicznym o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej. Analizując jego strukturę, można zauważyć, że jest to sól czwartorzędowa, posiadająca grupy chromoforowe. Dlatego metodą z wyboru zastosowaną do oznaczenia benzoesanu denatonium była wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC).

Wstępnie badania prowadzono z zastosowaniem klasycznej kolumny chromatograficznej LiChroCART (125 × 4 mm) z wypełnieniem Lichrospher 60 RP-select B, jednak znacznie lepsze wyniki osiągnięto przy zastosowaniu kolumny monolitycznej Chromolith Performance RP-18e (100 × 4,6 mm). Zastosowanie kolumny monolitycznej pozwoliło na uzyskanie znacznie większej czułości i selektywności oznaczeń oraz znacząco wpłynęło na zakres zastosowań opracowanej metody.

Stężenie benzoesanu denatonium określone w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi odpowiada stężeniu 3 mg/l. Ponieważ w trakcie wstępnych badań roztworu wzorcowego benzoesanu denatonium o takim stężeniu uzyskano piki chromatograficzne o stosunkowo dużej intensywności, postanowiono maksymalnie uprościć procedurę przygotowania próbek do analizy. Próbkę alkoholu etylowego umieszczano bezpośrednio w naczynkach pomiarowych, a w sytuacji, gdy płyny nie były całkowicie klarowne, odwirowywano je. Na rycinie 2 przedstawiono chromatogram roztworu wzorcowego benzoesanu denatonium (Bitrexu) o stężeniu 3,0 mg/l.

Do rozdzielania chromatograficznego zastosowano warunki podane w rozdziale „Materiał i metody”. Podczas analizy roztworów wzorcowych benzoesanu denatonium w wymienionych warunkach uzyskano dwa piki chromatograficzne odpowiadające prawdopodobnie dwóm z trzech możliwych form tego związku występującym w roztworach wodno-alkoholowych, tj. formie niezdisocjowanej benzoesanu denatonium (BD), jonowi benzoesanowemu (B<sup>-</sup>) oraz jonowi denatonium (D<sup>+</sup>). Pik chromatograficzny o czasie retencji 9,05 min wykazywał dwa maksima absorpcji – około 205 nm i 230 nm, natomiast pik o czasie retencji 10,30 min miał jedno maksimum (około 205 nm).

Występowanie dwóch lub większej ilości pików chromatograficznych pochodzących od jednej substancji nie jest zjawiskiem częstym, ale jest to możliwe w przypadku substancji ulegających dysocjacji, do których zaliczyć można sole czwartorzędowe. Ponieważ zgodnie z podstawowymi prawami chemicznymi stężenie zdisocjowanych jonów oraz formy niezdisocjowanej są ściśle skorelowane z wyjściowym stężeniem związku, każdy z uzyskanych pików chromatograficznych mógł być użyty do wykonania analiz ilościowych. Występowanie więcej niż jednego pików pochodzącego od jednej

substancji pozwala na zwiększenie precyzji oznaczeń niż w przypadku, gdy dwa lub więcej pików zostanie użytych do wykonania obliczeń.

Ponieważ na podstawie uzyskanych widm nie było możliwe określenie, który pik chromatograficzny odpowiada poszczególnym formom benzoesanu denatonium występującym w roztworze, wykonano analizę roztworu wzorcowego kwasu benzoesowego. Dla tego związku uzyskano na chromatogramie pik o czasie retencji 9,05 min i dwóch maksimach absorpcji (około 205 nm i 230 nm). Jego porównanie z chromatogramami benzoesanu denatonium wskazało, że pierwszy z pików pochodzi od jonów benzoesanowych. A zatem analiza zawartości benzoesanu denatonium w napojach alkoholowych wykonana na podstawie analizy pierwszego z pików była pośrednią analizą poprzez określenie zawartości jonów benzoesanowych.

Wykorzystywanie metod pośrednich jest częstą praktyką w laboratoriach toksykologicznych. Do takich oznaczeń zaliczyć należy np. oznaczanie zawartości alkoholu we krwi metodą enzymatyczną ADH, gdzie stężenie alkoholu jest proporcjonalne do powstałej w wyniku jego reakcji z NAD<sup>+</sup> (w obecności enzymu ADH) zredukowanej formy NADH, która wykazuje specyficzną absorpcję przy długości fali 340 nm. Ponieważ nie dysponowano wzorcem innej soli zawierającej jony denatonium, nie było możliwe rozstrzygnięcie, czy pik chromatograficzny o czasie retencji 10,30 min pochodzi od kationów denatonium czy też od niezdisocjowanych cząsteczek benzoesanu denatonium. Niemniej jednak można przyjąć, że wielkość sygnału jest proporcjonalna do ilości jonów denatonium w roztworze.

Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej przygotowano roztwory wzorcowe benzoesanu denatonium w spirytusie rektyfikowanym nie zawierającym tego związku. Stężenie Bitrexu w poszczególnych roztworach wynosiło: 0,0; 1,5; 3,0; 6,0; 9,0 i 12,0 mg/l. Dokładność sporządzonych roztworów wzorcowych została oceniona w ramach badań międzylaboratoryjnych dla roztworu alkoholu stężonego Bitrexem w ilości 3,0 mg/l i uzyskano wynik zgodny z oczekiwanym ( $2,9 \pm 0,3$  mg/l). Krzywe kalibracyjne sporządzono dla obu pików chromatograficznych, przy czym dla pików o czasie retencji 9,05 min analizy prowadzono przy długości fali 230 nm, natomiast dla pików o czasie retencji 10,30 min przy długości fali 205 nm. Dla obu pików uzyskano liniową zależność ich powierzchni od stężenia Bitrexu w badanym zakresie (1,5–12 mg/l). Wartości współczynnika korelacji były w obu przypadkach większe niż 0,999. Wykresy kalibracyjne przedstawiono na rycinie 3.

Jak wynika z wykresu 3, większą czułość, którą można określić poprzez nachylenie krzywej kalibracyjnej, uzyskuje się dla pików odpowiadających jonowi denatonium. Następnie na podstawie wykresu kalibracyjnego wyznaczono również granice wykrywalności (*LOD*)

i oznaczalności ( $LOQ$ ), które – niezależnie od pików użytego do obliczeń – wynosiły odpowiednio: 0,1 mg/l i 0,3 mg/l. Zbliżone wartości  $LOD$  i  $LOQ$  obliczone w oparciu o piki, dla których uzyskano różną czułość, mogą wydawać się zastanawiające. Wyjaśnieniem tego zjawiska jest większa wartość błędu przypadkowego (mniejsza precyzja) przy pomiarach dla pików o większej czułości. Uzyskana wartość  $LOQ$  jest dziesięciokrotnie mniejsza niż minimalna ilość Bitrexiu, jaką należy dodawać w celu skażenia spirytusu. Należy zatem stwierdzić, że opracowana metoda może być stosowana do badania tego typu płynów.

Zastosowanie dwóch pików chromatograficznych do wyznaczenia stężenia związku pozwala na jego lepsze oszacowanie (uzyskuje się dwa wyniki w trakcie jednej analizy). Błąd wyznaczenia stężenia benzoesu denatonium w opracowanym zakresie pomiarowym wynosił poniżej 2%.

Obecność benzoesu denatonium w wyrobach spirytusowych potwierdzano za pomocą spektrometrii mas. Badania prowadzono w warunkach określonych w rozdziale „Materiał i metody”. Pomiary prowadzono zarówno przy jonizacji dodatniej ( $ES^+$ ), jak i ujemnej ( $ES^-$ ). Podczas analiz skażonych spirytusów przy obu rodzajach jonizacji nie stwierdzano jonów masowego odpowiadającego masie cząsteczkowej związku, czyli  $m/z = 446$  (w badaniach wstępnych stosowano zakres mas  $m/z = 25-500$ ). Przy jonizacji dodatniej najbardziej charakterystycznym jonem masowym okazał się jon o stosunku  $m/z = 325$ , masą odpowiadający jonowi denatonium. Innymi jonami masowymi o stosunkowo dużej intensywności były jony o  $m/z = 144$  i  $135$ . Podczas analiz przy jonizacji ujemnej stwierdzano obecność jonów masowego o stosunku  $m/z = 121$ , co odpowiada masie jonów benzoesanowych. Ponadto powstawał drugi charakterystyczny jon o  $m/z = 89$ . Widma masowe roztworu wzorcowego spirytusu skażonego Bitrexiem o stężeniu 3 mg/l przedstawiono na rycinie 4.

Opracowana procedura została zastosowana do wyznaczenia stężenia benzoesu denatonium w wyrobach spirytusowych. Były to zarówno konsumpcyjne napoje alkoholowe zakwestionowane w restauracjach, pubach czy u osób fizycznych, jak też wyroby przemysłowe sporządzone na bazie skażonego spirytusu.

Otrzymane wyniki były zaskakujące. Tylko dla dwóch badanych próbek skażonego spirytusu uzyskano zgodność stężeń wyznaczonych na podstawie jonów benzoesanowych i drugiego pików, którego sygnał był zależny od stężenia jonów denatonium w roztworze. W większości przypadków uzyskiwano tylko jeden pik odpowiadający jonom benzoesanowym. Kontrolnie przebadano konsumpcyjne napoje alkoholowe będące w posiadaniu Pracowni Badania Alkoholów i Narkotyków i w żadnym z nich nie stwierdzono obecności zarówno jonów benzoesanowych, jak i sygnału analitycznego zależnego od stężenia jonów denatonium. Badaniu poddano również

roztwory wzorcowe Bitrexiu przechowywane przez kilka tygodni i nie stwierdzono spadku stężenia żadnej z form tego związku. Analiza za pomocą spektrometrii mas potwierdziła te wyniki. Dla większości próbek przy jonizacji dodatniej nie stwierdzano jonów o  $m/z = 325$ , czyli pochodzącego od jonów denatonium; pojawiał się natomiast dodatkowy pik masowy o stosunku  $m/z = 360$ . Jednocześnie widma masowe przy jonizacji ujemnej ulegały przekształceniu i pojawiały się w nich dodatkowe piki masowe, których układy mogły wskazywać na obecność w roztworze chlorowcopochodnych. Powyższe wyniki oraz uzyskane z policji dane operacyjne pozwoliły na przyjęcie hipotezy, że osoby wprowadzające na nielegalny rynek wyroby sporządzone na bazie skażonego spirytusu, usuwają obecny w nich Bitrex. Odbywa się to najczęściej poprzez dodanie podchlorynu sodu. Widma masowe roztworu wzorcowego spirytusu skażonego Bitrexiem o stężeniu 3 mg/l, do którego dodano podchloryn sodu w ilości 50 l/ml, przedstawiono na rycinie 5.

Jak wynika z ryciny 5, widma masowe skażonego spirytusu zarówno przy jonizacji dodatniej, jak i ujemnej, ulegają bardzo dużym zmianom po dodaniu podchlorynu sodu. Zagadnieniu wpływu podchlorynu sodu na zawartość benzoesu denatonium poświęcona została odrębna praca autorów [16].

Zanik pików, którego sygnał zależy od stężenia denatonium w próbce, oznacza, że jony te zostały usunięte z roztworu. W konsekwencji należy stwierdzić, że stężenie samego Bitrexiu jest poniżej granicy wykrywalności metody. Wykonanie obliczeń w oparciu o pik odpowiadający stężeniu jonów benzoesanowych doprowadziłoby do odmiennego wniosku, ponieważ jony te były nadal obecne w roztworze. A zatem, jeśli celem analizy jest wyznaczenie stężenia Bitrexiu w roztworze przy zastosowaniu opracowanej metody, konieczne staje się wykonywanie obliczeń w oparciu o pik o czasie retencji 10,30 min, którego stężenie jest proporcjonalne do zawartości jonów denatonium w roztworze. Porównanie uzyskanego w ten sposób stężenia ze stężeniem wyznaczonym w oparciu o zawartość jonów benzoesanowych może wykazać próby usunięcia Bitrexiu z roztworu. Wyniki te mogą być potwierdzane metodą spektrometrii mas.

Badaniem w Instytucie Ekspertyz Sądowych poddano również techniczne 20% roztwory Bitrexiu stosowane do skażenia alkoholu. Wyniki również były zaskakujące. Okazało się, że roztwory te zawierały znacznie mniejsze jego ilości niż deklarowane. Wyznaczone stężenie bitrexiu metodą HPLC w takich płynach wynosiło 10–12%. Płyny stosowane do skażenia są badane przed ich użyciem, jednak metody analityczne stosowane w tym celu są wysoce nieselektywne (najczęściej do takich badań wykorzystuje się pomiar gęstości). Możliwe jest zatem, że niższa zawartość Bitrexiu stwierdzana często w badanych płynach wynika z mniejszej jego zawartości w płynie skażającym.

#### 4. Podsumownie

Opracowana metoda HPLC pozwala na wyznaczenie stężenia benzoesu denatonium (Bitrexu) poprzez oznaczenie zawartości jonów benzoesanowych, jak również zawartości jonów denatonium lub cząsteczek benzoesu denatonium. Analiza zawartości tych składników pozwala ustalić, czy badany płyn zawiera Bitrex, czy też płyn ten był skażony Bitrexem, a następnie został odkazony.

Metoda spektrometrii mas może być zastosowana do potwierdzania obecności benzoesu denatonium w skażonych spirytusach. Pozwala ona również często ocenić, czy dowodowy płyn zawiera związki powstałe w wyniku reakcji benzoesu denatonium z czynnikiem utleniającym, np. podchlorynem sodu.