



ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF DENATONIUM BENZOATE (BITREX) REMOVAL FROM DENATURED SPIRIT PREPARATIONS USING SODIUM HYPOCHLORITE

Dariusz ZUBA, Czesława ŚWIEGODA, Bogumiła BYRSKA, Wojciech LECHOWICZ

Institute of Forensic Research, Krakow

Abstract

The aim of the study was to assess the effectiveness of purification of spirit preparations denatured by Bitrex by means of sodium hypochlorite. The subject matter was chosen following analysis of evidential material submitted to the Institute, which indicated that such a process might be applied by companies trading in products prepared on the basis of alcohol, e.g. windscreen washers, disinfectants, alcoholic solvents, or barbecue lighting fluid. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used in the analysis and the obtained results were confirmed by means of mass spectrometry (MS). The addition of sodium hypochlorite to spirit preparations causes the formation of a white precipitation, the amount of which increases together with an increase in the amount of sodium hypochlorite added to the solution. An increase in the amount of added sodium hypochlorite causes a decrease in the concentration of denatonium benzoate. Introduction of sodium hypochlorite at a concentration of 12–15% active chlorine in an amount corresponding to 0.05 ml per 1 litre of spirit denatured by Bitrex at 3 mg/l caused a decrease in denatonium ions concentration in the solution, whereas addition of an amount corresponding to 0.20 ml/l of spirit caused its disappearance. The lack of denatonium ions in the solution meant that the concentration of Bitrex in the solution was below the limit of detection and, thus, it was practically removed. Such a small addition of sodium hypochlorite does not significantly influence the pH of the solution. Disappearance of denatonium ions also caused a disappearance of the characteristic bitter taste of Bitrex, which was assessed by means of an organoleptic examination. Addition of the mentioned amounts of sodium hypochlorite did not cause a decrease in the concentration of benzoate ions. Since consumer (beverage) spirits do not contain benzoate ions, their detection in a seized alcoholic beverage indicates with high probability that it was previously denatured by Bitrex. The benzoate ions can also be removed from solution by addition of sodium hypochlorite, but the amount required in this case is significantly higher: approximately 80 ml per 1 litre of spirit denatured by 3 mg of Bitrex. In this case, the pH of the solution is significantly raised (pH = 11–12), which makes it unsuitable for consumption. Such a product would have to be further purified before being introduced onto the illegal market.

Key words

Denatured alcohol; Denatonium benzoate; Removal.

Received 9 December 2005; accepted 30 December 2005

1. Introduction

Denatonium benzoate, Bitrex, is a substance that has been used all over the world for many years to denature industrial alcohol. The common name for this chemical, denatonium, alludes to this application. It is

characterised by a very intensive, bitter taste, which means that a very small addition makes products unsuitable for consumption. Therefore, it is an ideal additive to prevent people from accidentally ingesting liquids such as detergents, disinfectants, cleaning fluids, and garden and horticultural products. Differences

in perception of its bitter taste have also been observed in children, adults and elderly persons [10]. The data indicate that the addition of denatonium benzoate would be expected to significantly reduce, but most likely not eliminate, the probability of an accidental ingestion of products prepared on the basis of alcohol denatured by this substance [1, 6]. Widespread application of this compound has started in the United States. At the beginning of the nineties, in Oregon, mandatory addition of this denaturant to automotive products containing at least 10% of ethylene glycol or at least 4% of methanol was introduced [4]. In 1995, the Toxic Household Products Statute required 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 [9]. Since that time, many papers indicating the preventative action of denatonium benzoate have been published [2, 8, 11].

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 on agents permitted to denature ethyl alcohol [4]. Although this compound has been listed as a denaturing agent for many years, it is only in the last few years that a significant increase in its use has been observed. There may be several reasons for this. Its addition does not influence the basic physicochemical properties of ethyl alcohol, because the amount of denatonium benzoate that should be added in accordance with the above mentioned decree is small, i.e. 0.3 g per 100 l of 100% ethyl alcohol. Bitrex can also be added in the form of 20% alcoholic solution.

The only feature of ethyl alcohol that changes significantly after addition of Bitrex is its taste. Previously, the most popular denaturant in Poland was methanol. Unfortunately, it led to many deaths of persons consuming industrial alcohol. In 2002, methanol was withdrawn from the list of denaturants of ethyl alcohol. The second important reason for the growth in the popularity of Bitrex application is the tax regulations currently in force in Poland. According to the decree of the Ministry of Finance dated 26 April 2004 on exemption from excise tax [5], “the sale of ethyl alcohol denatured by denatonium benzoate in amounts not less than 1 g per 100 dm³ of 100% vol. ethyl alcohol, dyed violet by addition of pure crystal violet in an amount not less than 160 mg per 100 dm³ of 100% vol. ethyl alcohol, in individual containers of volume up to 1 litre” is excluded from special tax supervision. It is highly probable that this clause led to great amounts of ethyl alcohol denatured by Bitrex being present on the illegal market. The intense bitter taste of alcohol dena-

tured by Bitrex, however, remains a problem for illegal producers of alcoholic beverages. However, previous studies by the authors [12] and operational materials of the police have indicated that illegal producers remove Bitrex by addition of sodium hypochlorite to the denatured alcohol.

2. Materials and methods

The standard of denatonium benzoate purchased from Sigma-Aldrich was used in the study. Standard solutions of Bitrex were prepared by weighing out an appropriate amount of denatonium benzoate and dissolving in rectified spirit produced by Polmos Warszawa, Poland. The accuracy of the Bitrex concentration in the prepared solution was assessed in inter-laboratory examinations. Sodium hypochlorite at a concentration of 12–14% active chlorine, purchased from Idalia, was applied in the study.

Determinations were also performed on evidential material. Samples of ethyl alcohol secured over the course of several months in 2005 from a plant dealing with its processing were used for this purpose. This plant purchased the denatured alcohol and produced different products, including disinfectants, window cleaners or windscreen washer fluid.

In order to determine the denatonium benzoate content of the examined liquids, high-performance liquid chromatography (HPLC) was applied. Measurements were performed using a LaChrom (Merck/Hitachi) instrument, which was equipped with a diode-array detector (DAD). Chromatographic separation was achieved on a Chromolith Performance RP-18e (100 × 4.6 mm) monolithic column. Measurements of denatonium benzoate concentration were taken at two wavelengths: 205 nm and 230 nm. Mass spectrometry (MS) was applied to confirm the presence of denatonium benzoate. A Quattro Micro API mass spectrometer manufactured by Micromass was applied in the study. Both positive (ES⁺) and negative (ES⁻) ionisation mode were used. The analytical details of both chromatographic methods have been published in another paper by the authors [12].

In order to assess the influence of sodium hypochlorite on the content of denatonium benzoate in denatured alcohol, a stock standard solution was prepared by addition of Bitrex to rectified alcohol. The minimal amount required by the decree of the Ministry of Agriculture and Rural Development, that is 3 mg/l, was used. Then, 100-ml portions of solution were measured into flasks and sodium hypochlorite at a concentration of 12–14% active chlorine was added in the

following amounts: 0 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l and 20 μ l. In order to maintain a constant total volume of the solution, appropriate volumes were removed from the flasks before addition of hypochlorite. This ensured that the concentration of Bitrex did not decrease due to sample dilution. An identical procedure was repeated with greater additions of sodium hypochlorite. 10-ml portions of denatured alcohol were measured into flasks and sodium hypochlorite was added in the following amounts: 0 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 400 μ l, 600 μ l and 800 μ l. The above amounts were selected on the basis of preliminary studies.

3. Results and discussion

The HPLC method used by the authors [12] allowed two chromatographic peaks to be obtained during analysis of standard solutions of denatonium benzoate. The first peak at retention time 9.05 min corresponded to benzoate ions, whereas the second one, at retention time 10.30 min, was dependent on the concentration of denatonium ions (it originated from denatonium ions or from undissociated molecules of denatonium benzoate). Measurement was performed at 230 nm for the benzoate ion and at 205 nm for the ion dependent on denatonium concentration.

The addition of sodium hypochlorite to ethyl alcohol denatured by Bitrex causes formation of a white gelatinous precipitation. Its volume and the results of elemental analysis performed by means of the SEM-EDX method as well as spectrometric analysis in the infra-red region (FT-IR) indicate that the main component is sodium hypochlorite. The precipitation of sodium hypochlorite after addition to denatured alcohol could result from the lower solubility of this salt in alcohol compared with water.

In order to remove the formed precipitates, the samples were centrifuged. Then, the liquid located above the precipitate was transferred into measurement vials and HPLC analysis was performed. In order to assess the measurements precision, three samples were collected from each solution. The results are shown in Figure 1.

As can be seen from data shown in Figure 1, the addition of sodium hypochlorite significantly influences the content of denatonium benzoate in denatured spirit. Adding as little as approximately 5 μ l per 100 ml of spirit, which is equivalent to approximately 0.05 ml per 1 litre of spirit, causes a decrease in peak area at retention time 10.30 min, i.e. denatonium ions or undissociated molecules of denatonium benzoate (whose concentration also depends on the concentra-

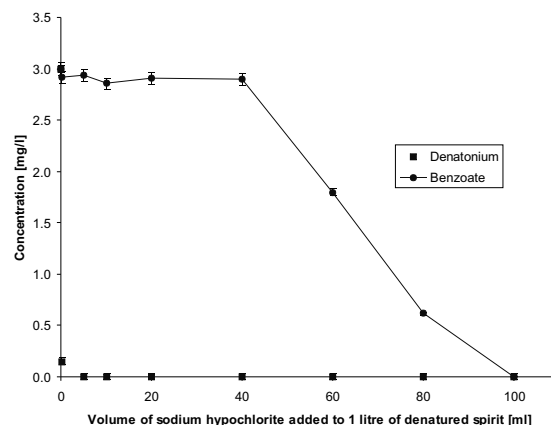
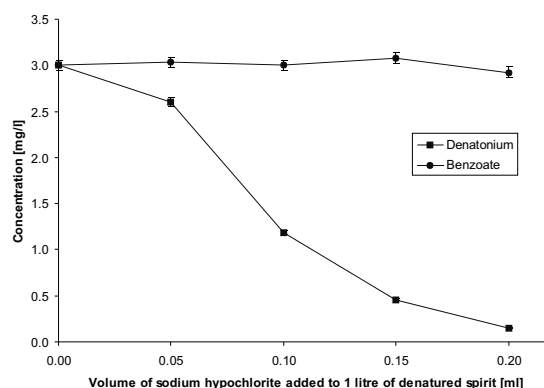


Fig. 1. The relationship between the areas of chromatographic peaks originating from denatonium benzoate and the amounts of sodium hypochlorite added to denatured spirit.

tion of denatonium ions). This means that the concentration of denatonium benzoate has been lowered and, therefore, the action of the denaturant has been weakened. According to Polish law, such activity is a crime. In accordance with Articles 13 and 14 of the Law dated 2 March 2001 on spirit production, production and bottling of spirit products and production of tobacco products [3] “any person that purifies denatured spirit or otherwise reduces the action of a denaturing agent is liable to a fine, a penalty of restriction of liberty, or imprisonment of up to 1 year. If the crime was the regular source of income for the perpetrator, the person is liable to a penalty of imprisonment up to 3 years”.

Adding 20 μ l of sodium hypochlorite to 100 ml of denatured alcohol caused a disappearance of the peak at retention time 10.30 min. This means that the concentration of Bitrex in solution was below the limit of detection, which is 0.1 mg/l. Such a small addition of sodium hypochlorite does not significantly influence the pH of the solution. The result of performed organoleptic examinations of the above liquid was consistent with expectations, indicating that the char-

acteristic bitter taste of Bitrex had disappeared. The obtained product was difficult to distinguish from consumer (beverage) alcohol.

Further addition of sodium hypochlorite to alcohol denatured by Bitrex can also lead to the disappearance of the peak at retention time 9.05 min, i.e. benzoate ions. But the amount of sodium hypochlorite required for this purpose is very large and amounts to about 80 ml per 1 litre of denatured spirit. Such great addition of a salt of a weak acid and strong base causes a significant rise in pH (pH = 11–12). The consumption of a strongly basic liquid is a threat to the health or even life of consumers. In passing, it should be noted that in the previous year, spirits with a very strong basic chemical reaction were delivered for investigation to the Institute of Forensic Research. This may confirm the thesis that the mentioned procedure is applied by illegal producers of alcoholic beverages. On the other hand, it seems that the basic pH of spirit from which Bitrex has been removed can be simply eliminated, for example, by adding an appropriate amount of acid.

The above results incline us towards the conclusion that after addition of sodium hypochlorite to alcohol denatured by Bitrex, there is a reaction of hypochlorite anions with denatonium cations and probably co-precipitation of them with sodium hypochlorite ensues. The added sodium hypochlorite can also oxidize the denatonium ions (hypochlorite is a strong oxidant, whereas Bitrex is sensitive to such substances). The occurring processes cause a decline in Bitrex concentration in solution. Adding large amounts of sodium hypochlorite also causes the disappearance of the second ion originating from Bitrex. This can result from the precipitation of sodium benzoate as well as from oxidation of compounds present in solution.

The above results were confirmed by means of mass spectrometry. During analysis of alcohol denatured by Bitrex in positive-ionisation mode, the peak corresponding to the mass of the denatonium ion ($m/z = 325$) was obtained, whereas in negative-ionisation mode – the peak corresponding to the mass of benzoate ion ($m/z = 121$). Next, samples of alcohol denatured by Bitrex with a small addition of sodium hypochlorite (10 μ l per 100 ml of denatured alcohol) were analysed. In positive-ionisation mode, beside the ion at m/z ratio = 325, an additional peak of mass 360 appeared (mass greater than that of chlorine). In negative-ionisation mode, the configuration of peaks characteristic for chloride derivatives was obtained. Analysis of denatured spirit, to which was added sodium hypochlorite in an amount causing disappearance of the peak at retention time 10.30 min on the

HPLC chromatogram, indicated disappearance of the peak at $m/z = 325$, corresponding to denatonium ions. Analysis of the solution in negative-ionisation mode confirmed the presence of chloride derivatives. The mass spectra of the mentioned solutions in positive-ionisation mode are shown in Figure 2, whereas in negative-ionisation mode – in Figure 3.

4. Results of evidential samples analyses

The worked out method of denatonium benzoate determination and the results of the performed experiments were utilised in expert opinions. The results of examinations obtained in one of the cases are presented below.

A procurator conducting an investigation suspected that, in a plant dealing with processing of denatured alcohol, the denaturant, i.e. Bitrex, was being removed. The mechanism of this process was not known. The plant bought the denatured alcohol and it was used for production of different products, e.g. antibacterial fluid, window cleaners or windscreen washer fluid. The liquids and copies of plant norms used in preparing of the products were submitted for examination.

Results of analyses by means of high-performance liquid chromatography are shown in Table I.

TABLE I. THE CONCENTRATION OF DENATONIUM BENZOATE CALCULATED BY THE INDIRECT METHOD USING THE CONCENTRATION OF BENZOATE IONS (C_{benzoate}) AND DENATONIUM IONS OR UNDISSOCIATED MOLECULES OF DENATONIUM BENZOATE ($C_{\text{denatonium}}$)

Evidence nr	C_{benzoate} [mg/l]	$C_{\text{denatonium}}$ [mg/l]
1	1.2	1.0
2	1.3	1.1
3	1.1	–
4	1.1	–
5	1.9	–
6	1.8	–
7	1.4	–
8	1.8	–
9	1.4	–
10	1.7	–
11	2.1	–
12	11.5	9.1

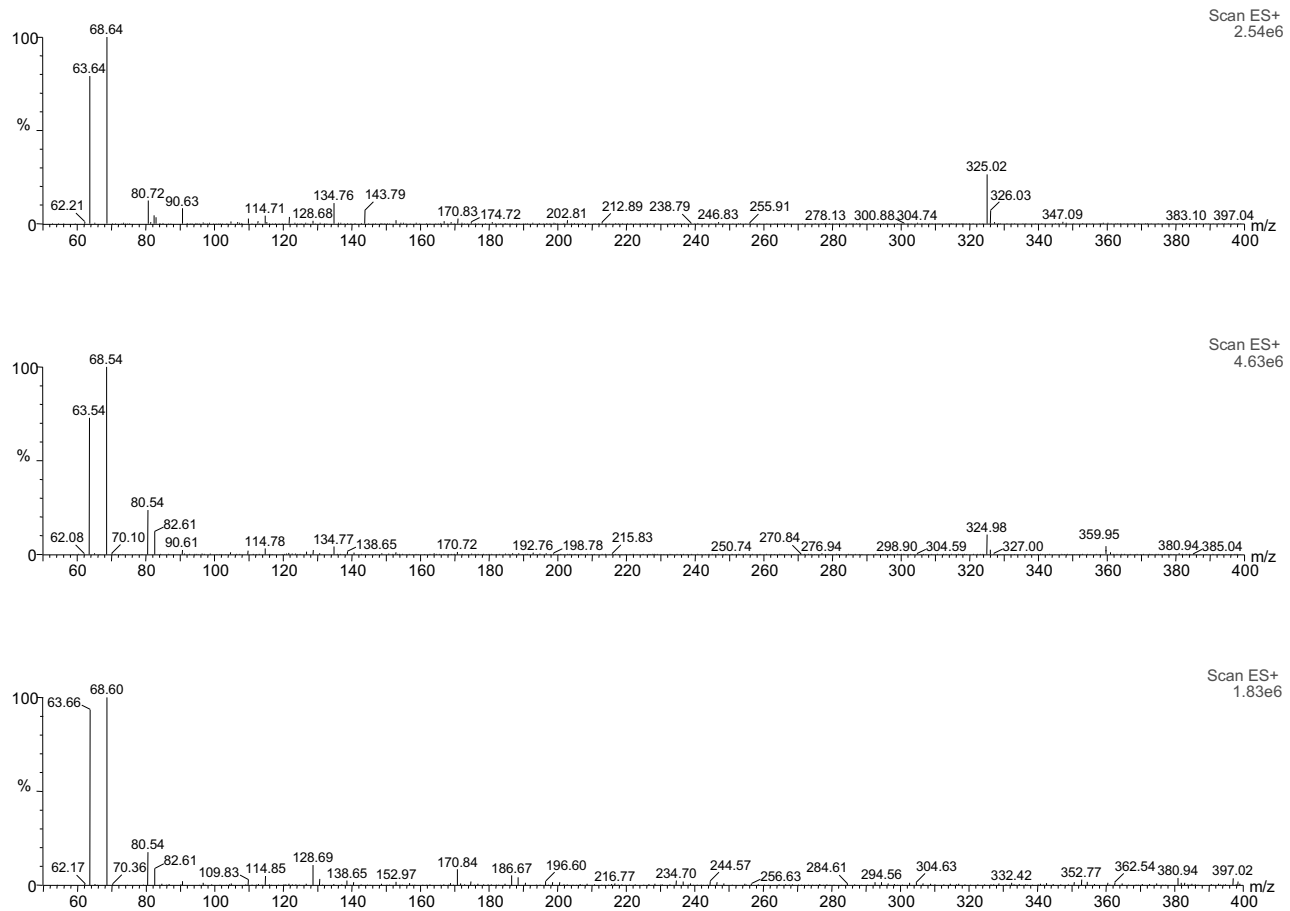


Fig. 2. Mass spectra of alcohol denatured by Bitrex in positive-ionisation mode: a) without sodium hypochlorite, b) after addition of sodium hypochlorite in the amount of 100 µl/l, c) after addition of sodium hypochlorite in the amount of 80 ml/l.

As can be seen from data in Table I, the evidential spirits can be divided into two or three groups. In evidences 1 and 2, the concentrations of denatonium benzoate calculated on the basis of two different chromatographic peaks were equal (within the range of analytical error of the method). In evidences 3–11, the presence of benzoate ions was ascertained, but the second peak at retention time 10.30 min was not detected on HPLC chromatograms. In the case of the liquid from evidence 12, the concentration of Bitrex calculated on the basis of benzoate ions content was higher than that calculated on the basis of analysis of the second ion and the difference exceeded the analytical error significantly.

The above liquids were also subjected to analysis by means of mass spectrometry. In liquids of evidences 1 and 2, the presence of denatonium ions was confirmed (and thus that of Bitrex). Furthermore, the results of the studies indicated that the above mentioned liquids do not contain products of the reaction

between denatonium benzoate and sodium hypochlorite. The concentrations of Bitrex determined in the liquids of evidences 1 and 2 were lower than the amount required according to the decree of the Ministry of Agriculture and Rural Development and therefore, according to the regulation being in force, could not be classified as denatured ethyl alcohol. On the other hand, it has been observed in the practice of the Institute of Forensic Research that 20% technical solution of Bitrex contains significantly lower amounts of this substance. The concentration of Bitrex determined in such liquids by means of the HPLC method was 10–12%. The liquids used for denaturation are examined before their use, but the analytical methods applied for this purpose are highly non-selective (measurement of density is used most often). Thus, it is possible that the lower content of Bitrex determined in the liquids of evidences 1 and 2 resulted from its lower content in the denaturing fluid.

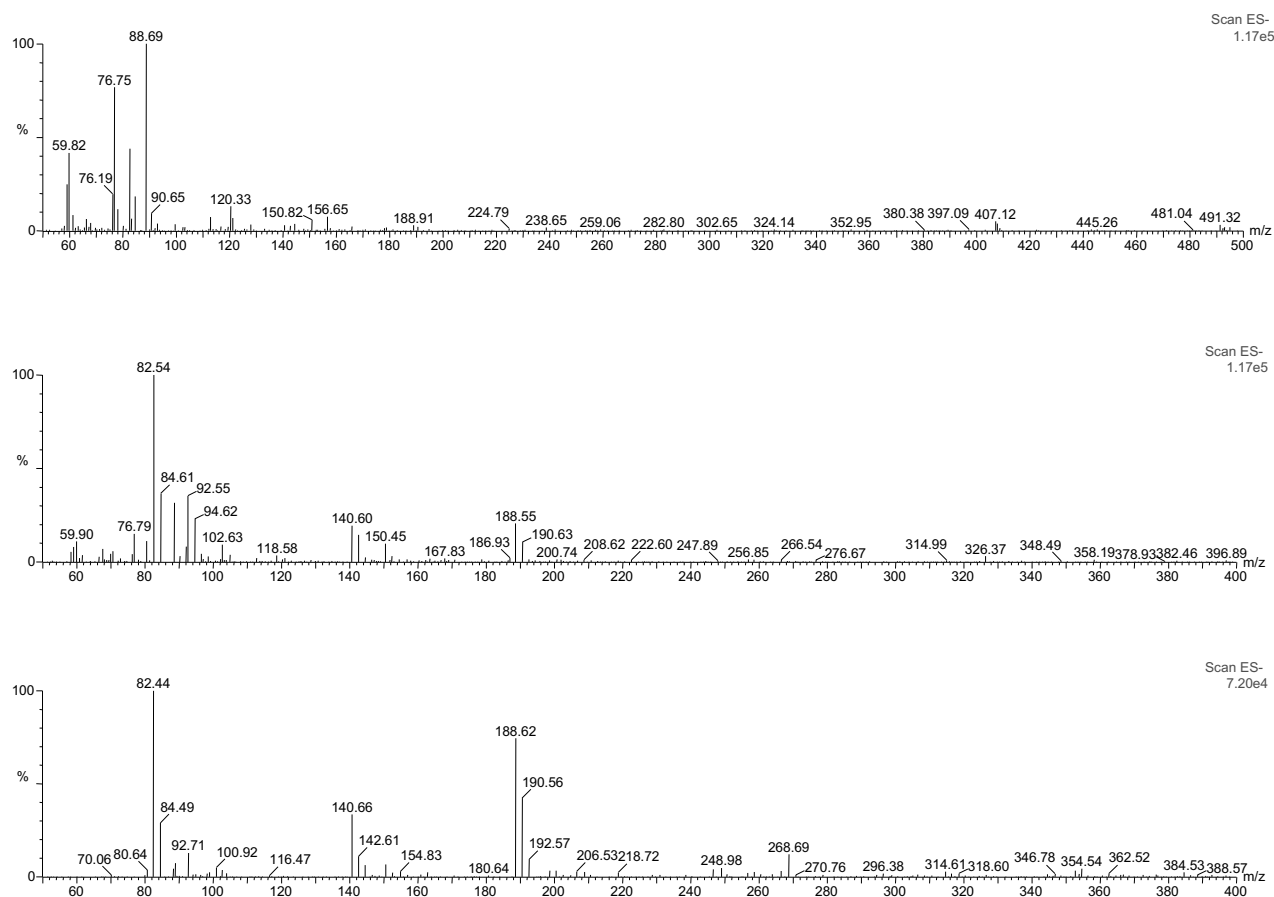


Fig. 3. Mass spectra of alcohol denatured by Bitrex in negative-ionisation mode: a) without sodium hypochlorite, b) after addition of sodium hypochlorite in the amount of 100 µl/l, c) after addition of sodium hypochlorite in the amount of 80 ml/l.

Spectrometric analysis of the liquids of evidences 3–11 confirmed that they did not contain denatonium ions (and therefore they did not contain Bitrex), whereas the presence of mass peaks that could originate from the products of reaction between denatonium benzoate and sodium hypochlorite were detected. Therefore, one can assume that liquids of evidences 3–11 contained denatonium benzoate (Bitrex) and it was removed afterwards, e.g. by addition of sodium hypochlorite.

Analysis of the liquid of evidence 12 by means of mass spectrometry confirmed that it contains denatonium benzoate (Bitrex). In the obtained mass spectra, both in positive- and negative-ionisation mode, additional peaks that probably came from products of the reaction between denatonium benzoate and sodium hypochlorite were observed. They were identical to those obtained during the analysis of standard solutions of denatonium benzoate in spirit to which sodium hypochlorite had been added. This confirmed the hypothesis resulting from analysis by means of the HPLC

method that some of the denatonium ions were removed from evidence liquid 12, probably by addition of sodium hypochlorite.

5. Conclusions

The results of performed studies show unambiguously that the addition of sodium hypochlorite to ethyl alcohol denatured by Bitrex causes partial or total removal of this denaturant. The effectiveness of removal depends on the volume of sodium hypochlorite added to the solution.

The worked out procedure of spirit products examination by means of the HPLC method and mass spectrometry allows determination of the concentration of denatonium benzoate (Bitrex) by the determination of benzoate ions content as well as the content of benzoate ions or molecules of denatonium benzoate. Analysis of the content of these components allows us to establish whether the examined liquid contains Bitrex,

or whether it was denatured by Bitrex and purified afterwards. This information is of great importance in the preparation of expert opinions for courts.

References:

1. 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.
2. Carnahan R. M., Kutscher E. C., Obritsch M. D. [et al.], Acute ethanol intoxication after consumption of hair-spray, *Pharmacotherapy* 2005, 25, 1646–1650.
3. *Dziennik Ustaw* z dnia 11 kwietnia 2001 r., nr 31, poz. 353.
4. *Dziennik Ustaw* z dnia 11 sierpnia 2003 r., nr 163, poz. 1582.
5. *Dziennik Ustaw* z dnia 1 maja 2004 r., nr 97, poz. 966.
6. 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.
7. Henderson M. C., Neumann C. M., Buhler D. R., Analysis of denatonium benzoate in Oregon consumer products by HPLC, *Chemosphere* 1998, 36, 203–210.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Zuba D., Świągoda C., Byrska B. [et al.], Determination of denatonium benzoate (Bitrex) in denatured spirit preparations, *Problems of Forensic Sciences* 2005, 63, 275–287.

Corresponding author

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

OCENA EFEKTYWNOŚCI METODY USUWANIA BENZOESANU DENATONIUM (BITREXU) ZE SKAŻONYCH WYROBÓW SPIRYTUSOWYCH ZA POMOCĄ PODCHLORYNU SODU

1. Wprowadzenie

Benzoesan denatonium (Bitrex) jest substancją stosowaną od wielu lat na całym świecie do skażania alkoholu przeznaczanego do celów przemysłowych. Główny człon nazwy tego związku, denatonium, związany jest z tym zastosowaniem, ponieważ pochodzi od angielskiego słowa „denaturated”, czyli skażony (stąd też pochodzi polska nazwa „denaturat”). Charakteryzuje się on bardzo intensywnym, gorzkim smakiem, co powoduje, że już niewielki dodatek Bitrexu czyni wyrób nienadającym się do spożycia. Z tego względu jest idealnym dodatkiem zapobiegającym przypadkowemu przyjmowaniu przez ludzi takich płynów, jak detergenty, środki dezynfekujące, płyny czyszczące, środki wykorzystywane w ogródkach domowych czy produkty ogrodnicze. W badaniach zauważono różnice w percepcji jego gorzkiego smaku u dzieci, dorosłych i osób starszych [10]. Dane wskazują, że dodatek benzoesu denatonium zdaje się w znaczący sposób zmniejszać, choć nie do końca eliminować, prawdopodobieństwo przypadkowego spożycia produktów sporządzonych na bazie spirytusu skażonego tym związkiem [1, 6]. Powszechnie zaczęto stosować ten związek w Stanach Zjednoczonych, gdzie na początku lat dziewięćdziesiątych w stanie Oregon wprowadzono konieczność dodawania go do produktów stosowanych w samochodach, a zawierających co najmniej 10% glikolu etylowego lub co najmniej 4% metanolu [7]. Wydane w 1995 roku rozporządzenie dotyczące toksyczności produktów gospodarstwa domowego uznawało wymóg dodawania do nich benzoesu denatonium w stężeniu 30–50 ppm w celu zmniejszenia częstości poważnych zatruczeń dziećmi tymi produktami [9]. Od tego czasu opublikowano wiele prac wykazujących na jego prewencyjne działanie [2, 8, 11].

Benzoesan denatonium jest środkiem skażającym alkohol etylowy zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 11 sierpnia 2003 r. w sprawie środków dopuszczonych do skażania alkoholu etylowego [4]. Wprawdzie związek ten znajdował się na wykazie środków skażających już od wielu lat, to dopiero w ostatnich latach zauważono znaczny wzrost jego użycia. Wynikać to może z kilku przyczyn. 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. Jedyną cechą alkoholu etylowego, którą w znaczący sposób zmienia dodatek Bitrexu, jest jego smak. Poprzednio najpopularniejszym skaźnikiem w Polsce był metanol, co niestety doprowadziło do wielu zgonów osób spożywających alkohol przemysłowy. Metanol został w 2002 roku wycofany z listy substancji stosowanych jako skaźniki alkoholu etylowego. Drugim istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost popularności stosowania Bitrexu są obowiązujące obecnie przepisy podatkowe. Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Finansów z dnia 26 kwietnia 2004 r. w sprawie zwolnień od podatku akcyzowego [5], ze szczególnego nadzoru podatkowego wyłącza się „sprzedaż alkoholu etylowego skażonego benzoesanem denatonium w ilości nie mniejszej niż 1 g/100 dm³ alkoholu etylowego 100% vol., zabarwionego na fioletowo przez dodanie czystego fioletu krystalicznego w ilości nie mniejszej niż 160 mg/100 dm³ alkoholu etylowego 100% vol., w opakowaniach jednostkowych o pojemności do 1 litra”. Zapis ten spowodował prawdopodobnie, że duża ilość alkoholu etylowego skażonego Bitrexem znalazła się na nielegalnym rynku. Problemem dla nielegalnych producentów napojów alkoholowych pozostawał jednak intensywny, gorzki smak alkoholu skażonego Bitrexem. Jednak, jak wynikało z poprzednich badań [12] oraz materiałów operacyjnych policji, nielegalni producenci usuwają Bitrex poprzez dodanie do skażonego alkoholu podchlorynu sodu.

2. Materiał i metody

W badaniach wykorzystano wzorec benzoesu denatonium zakupiony w firmie Sigma-Aldrich. Roztwory wzorcowe Bitrexu sporządzano poprzez odważenie odpowiedniej ilości benzoesu denatonium i rozcieńczenie go spirytusem rektyfikowanym produkowanym przez Polmos Warszawa. Dokładność stężenia Bitrexu w sporządzonym roztworze została oceniona w ramach badań międzylaboratoryjnych. Do badań zastosowano również podchloryn sodu firmy Idalia o stężeniu 12–14% aktywnego chloru.

Ponadto przeprowadzono oznaczenia w materiale wodowym. Wykorzystano w tym celu próbki alkoholu etylowego zabezpieczonego w przeciągu kilku miesięcy 2005 roku w zakładzie zajmującym się jego przetwórstwem. Zakład ten kupował skażony alkohol, z którego wyrabiał różne produkty, np. płyny antybakteryjne,

płyny do mycia szyb czy płyny do spryskiwania szyb samochodowych.

W celu wyznaczenia zawartości benzoesu denatonium w badanych płynach zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Badania przeprowadzono za pomocą urządzenia LaChrom (Merck/Hitachi) wyposażonego w detektor szeregu diod (DAD). Rozdział chromatograficzny był prowadzony na kolumnie monolitycznej Chromolith Performance RP-18e (100 4,6 mm). Pomiaru stężenia benzoesu denatonium były wykonywane przy dwóch długościach fali: 205 nm i 230 nm. Do potwierdzenia obecności benzoesu denatonium wykorzystano metodę spektrometrii masowej (MS). W badaniach zastosowano spektrometr masowy Quattro Micro API firmy Micromass. Pomiarów dokonywano zarówno przy dodatniej, jak i ujemnej jonizacji. Szczegóły analityczne obu metod chromatograficznych zostały opublikowane w odrębnej pracy autorów [12].

W celu oceny wpływu podchlorynu sodu na zawartość benzoesu denatonium w skażonym alkoholu sporządzono podstawowy roztwór wzorcowy poprzez dodanie do spirytusu rektyfikowanego Bitrexu w minimalnej ilości wymaganej przez rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi, tj. 3 mg/l. Następnie do kolb miarowych odmierzone po 100 ml tego roztworu i dodano podchloryn sodu o stężeniu 12–14% aktywnego chloru w następujących ilościach: 0 µl, 5 µl, 10 µl, 15 µl i 20 µl. Przed dodaniem podchlorynu usunięto z kolb odpowiednio objętości roztworu, aby nie zwiększać całkowitej objętości roztworu, a tym samym nie zmniejszać stężenia Bitrexu. Identyczny eksperyment przeprowadzono dla większych dodatków podchlorynu sodu. Do kolb miarowych odmierzone po 10 ml roztworu skażonego alkoholu i dodano podchloryn sodu w następujących ilościach: 0 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 400 µl, 600 µl i 800 µl. Powyższe ilości zostały dobrane na podstawie badań wstępnych.

3. Wyniki i ich omówienie

Stosowana przez autorów metoda HPLC [12] pozwoliła na uzyskanie podczas analizy roztworów wzorcowych benzoesu denatonium dwóch pików chromatograficznych, z których pierwszy, o czasie retencji 9,05 min, odpowiadał jonowi benzoesanowemu, natomiast drugi, o czasie retencji 10,30 min, był zależny od stężenia jonów denatonium (pochodził bądź to od samych jonów bądź też niezdysoncjowanych cząsteczek benzoesu denatonium). Dla jonu benzoesanowego pomiar został przeprowadzony przy 230 nm, natomiast dla jonu zależnego od stężenia denatonium – przy 205 nm.

Dodanie podchlorynu sodu do alkoholu etylowego skażonego Bitrexem powoduje wytrącenie białego, serowatego osadu. Jego objętość oraz wyniki analizy pier-

wiastkowej przeprowadzonej za pomocą metody SEM-EDX i analizy spektrometrycznej w podczerwieni (FT-IR) wskazują, że jego głównym składnikiem jest podchloryn sodu. Wytrącenie się podchlorynu sodu po dodaniu do roztworu skażonego alkoholu może wynikać z mniejszej rozpuszczalności tej soli w alkoholu w porównaniu z wodą.

W celu usunięcia powstałych osadów próbki odwirowano. Następnie płyn z nad osadu przeniesiono do naczynek pomiarowych i poddano analizie metodą HPLC. W celu oceny precyzji oznaczeń z każdego roztworu pobrano po trzy próbki. Wyniki przedstawiono na rycinie 1.

Jak wynika z tych danych, dodatek podchlorynu sodu wpływa istotnie na zawartość benzoesu denatonium w skażonym alkoholu. Dodanie już niewielkiej jego ilości (rzędu 5 µl na 100 ml spirytusu, co odpowiada około 0,05 ml na 1 litr spirytusu) powoduje zmniejszenie powierzchni pików o czasie retencji 10,30 min, czyli jonów denatonium lub niezdysoncjowanych cząsteczek benzoesu denatonium (również zależnych od stężenia jonów denatonium). Oznacza to spadek stężenia benzoesu denatonium w skażonym spiry图斯ie, a tym samym osłabienie działania środka skażającego. Taka działalność według polskiego prawa jest przestępstwem. Zgodnie z art. 13 i 14 ustawy z dnia 2 marca 2001 r. o wyrobieniu spirytusu, wyrobieniu i rozlewie wyrobów spirytusowych oraz wytwarzaniu wyrobów tytoniowych [3] „kto odkaża spirytus skażony lub w jakikolwiek sposób osłabia działanie środka skażającego, podlega grzywnie, karze ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do roku. Jeżeli z popełnienia tego przestępstwa sprawca uczynił sobie stałe źródło dochodu, podlega karze pozbawienia wolności do lat 3”.

Dodanie 20 µl podchlorynu sodu do 100 ml skażonego spirytusu spowodowało zanik pików o czasie retencji 10,30 min, co oznacza, że stężenie Bitrexu w roztworze było poniżej granicy wykrywalności metody wynoszącej 0,1 mg/l. Tak niewielki dodatek podchlorynu sodu nie wpłynął w istotny sposób na odczyn chemiczny roztworu (pH). Przeprowadzone badania organoleptyczne powyższego płynu wskazały zgodnie z oczekiwaniami, że gorzki smak charakterystyczny dla Bitrexu zanikł, a otrzymany produkt był trudny do odróżnienia od alkoholu konsumpcyjnego.

Dalsze dodawanie podchlorynu sodu do alkoholu etylowego skażonego Bitrexem może doprowadzić również do zaniku pików o czasie retencji 9,05 min, a więc jonów benzoesanowych. Jednak ilość podchlorynu sodu, jaką należy użyć w tym celu, jest bardzo duża i wynosi około 80 ml na 1 litr skażonego spirytusu. Tak duży dodatek soli słabego kwasu i mocnej zasady powoduje znaczny wzrost odczynu chemicznego (pH = 11–12). Spożycie płynu o odczynie mocno zasadowym stanowi jednak zagrożenie dla zdrowia, a nawet życia potencjalnych konsumentów. Na marginesie należy zaznaczyć, że w ubieg-

łym roku do Instytutu Ekspertyz Sądowych dostarczono do badania spirytusy mające silnie alkaliczny odczyn. Potwierdzać to może tezę, że proceder dodawania podchlorynu sodu jest stosowany przez nielegalnych producentów napojów alkoholowych. Wydaje się jednak, że odczyn zasadowy spirytusu, z którego usunięto Bitrex, można w prosty sposób wyeliminować np. poprzez dodanie odpowiedniej ilości kwasu.

Powyższe wyniki skłaniają do wniosku, że po dodaniu podchlorynu sodu do alkoholu etylowego skażonego Bitrexem dochodzi do reakcji anionów podchlorynowych z kationami denatonium i następuje prawdopodobnie ich współstrącanie ze strącaniem samego podchlorynu sodu. Dodany podchloryn sodu może również utleniać jony denatonium (podchloryn należy do silnych utleniaczy, na które Bitrex jest wrażliwy). Zachodzące procesy powodują spadek stężenia Bitrexu w roztworze. Dodanie dużych ilości podchlorynu sodu powoduje zanik drugiego jonu pochodzącego z Bitrexu. Może to wynikać z wytrącenia benzoesanu sodu lub też może dochodzić do utleniania związków obecnych w roztworze.

Powyższe wyniki potwierdzono badaniami z zastosowaniem spektrometrii mas. W trakcie analizy spirytusu skażonego Bitrexem w jonizacji dodatniej uzyskano pik odpowiadający masę jonowi denatonium ($m/z = 325$), natomiast w jonizacji ujemnej – pik odpowiadający jonowi benzoesanowemu ($m/z = 121$). Następnie analizie poddano spirytus skażony Bitrexem, do którego dodano niewielką ilość podchlorynu sodu (10 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ skażonego alkoholu). Przy jonizacji dodatniej oprócz jonu o stosunku $m/z = 325$ pojawił się dodatkowy pik o masie 360 (masa większa o masę chloru). Przy jonizacji ujemnej uzyskano układy pików charakterystyczne dla chlorowcopochodnych. Analiza skażonego spirytusu, do którego dodano podchloryn sodu w ilości powodującej zanik pików o czasie retencji 10,30 min na chromatogramie HPLC, wskazała na zanik pików o $m/z = 325$, a więc odpowiadającym jonom denatonium. Analiza tego roztworu w jonizacji ujemnej potwierdziła obecność chlorowcopochodnych. Widma masowe omawianych roztworów przy jonizacji dodatniej przedstawiono na rycinie 2, natomiast przy jonizacji ujemnej – na rycinie 3.

4. Wyniki analiz próbek dowodowych

Opracowana metoda oznaczania benzoesanu denatonium oraz wyniki przeprowadzonych eksperymentów zostały wykorzystane w rutynowej pracy przy sporządzaniu ekspertyz. Poniżej przedstawiono wyniki badań otrzymane w jednej ze spraw.

Prokurator prowadzący sprawę podejrzewał, że w zakładzie zajmującym się przetwórstwem skażonego alkoholu następuje usuwanie środka skażającego, tj. Bitrexu. Mechanizm tego procesu nie był znany. Zakład ku-

pował skażony alkohol, z którego wyrabiał różne produkty, np. płyny antybakteryjne, płyny do mycia szyb czy płyny do spryskiwania szyb samochodowych. Do badań przesłano płyny oraz kopie norm zakładowych stosowanych przy sporządzaniu produktów. W tabeli I zebrano wyniki analiz metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Jak wynika z danych zawartych w tej tabeli, dowodowe spirytusy można podzielić na dwie lub trzy grupy. W dowodach nr 1 i 2 stężenie benzoesanu denatonium wyznaczone na podstawie dwóch różnych pików chromatograficznych było jednakowe (w granicach błędów analitycznych metody). W dowodach nr 3–11 stwierdzono obecność jonów benzoesanowych, nie stwierdzono natomiast na chromatogramach HPLC drugiego pików o czasie retencji 10,30 min. W przypadku płynu z dowodu 12 stężenie Bitrexu obliczone na podstawie zawartości jonów benzoesanowych było wyższe niż uzyskane na podstawie analizy drugiego pików, a różnica znacznie przekraczała błąd analityczny.

Powyższe płyny poddano również badaniom za pomocą spektrometru mas. W płynach z dowodów 1 i 2 potwierdzono obecność jonów denatonium (a tym samym Bitrexu). Wyniki tych badań wskazały również, że ww. płyny nie zawierają produktów reakcji benzoesanu denatonium z podchlorynem sodu. Stwierdzone stężenia Bitrexu w płynach z dowodów 1 i 2 były mniejsze niż wymagana minimalna ilość zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rolnictwa oraz Rozwoju Wsi i dlatego te płyny zgodnie z obowiązującym prawem nie mogły być zaliczone jako skażony alkohol etylowy. Z drugiej jednak strony z praktyki Instytutu Ekspertyz Sądowych wynika, że techniczny 20% roztwór Bitrexu zawiera znacznie mniejsze jego ilości. Wyznaczone stężenie Bitrexu metodą HPLC w takich płynach wynosiło 10–12%. Płyny stosowane do skażania są badane przed ich użyciem, jednak metody analityczne stosowane w tym celu są wysoce niespecyficzne (najczęściej do takich badań wykorzystuje się pomiar gęstości). Możliwe jest zatem, że niższa zawartość Bitrexu w płynach z dowodów 1 i 2 wynikała z mniejszej jego zawartości w płynie skażającym.

Analiza spektrometryczna płynów z dowodów 3–11 potwierdziła, że ww. płyny nie zawierają jonów denatonium (a więc nie zawierają Bitrexu), stwierdzono natomiast obecność pików masowych mogących pochodzić od produktów reakcji benzoesanu denatonium z podchlorynem sodu. Na tej podstawie można przyjąć, że płyny z dowodów 3–11 zawierały benzoesan denatonium (Bitrex), który następnie został z nich usunięty, np. poprzez dodanie podchlorynu sodu.

Analiza próbki płynu z dowodu 12 za pomocą spektrometru mas potwierdziła, że płyn ten zawiera benzoesan denatonium. W uzyskanych widmach masowych zarówno w jonizacji dodatniej, jak i ujemnej, zaobserwowano dodatkowe pików masowe pochodzące prawdopo-

dobnie od produktów reakcji podchlorynu sodu z Bitrexem, identyczne jak w trakcie analizy roztworu wzorcowego benzoesanu denatonium w spirytusie, do którego dodano podchloryn sodu. Potwierdziło to hipotezę wynikającą z wyników analiz metodą HPLC, że część jonów denatonium zostało usuniętych z płynu z dowodu 12, prawdopodobnie poprzez podanie podchlorynu sodu.

5. Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują jednoznacznie, że dodanie podchlorynu sodu do alkoholu etylowego skażonego Bitrexem powoduje częściowe lub całkowite usunięcie tego środka skażającego. Efektywność oczyszczania zależy od objętości dodanego podchlorynu sodu.

Opracowana procedura badania wyrobów spirytusowych za pomocą metody HPLC oraz spektrometrii mas pozwala na wyznaczenie stężenia benzoesanu denatonium (Bitrexu) poprzez oznaczenie zawartości jonów benzoesanowych, jak również zawartości jonów denatonium lub cząsteczek benzoesanu denatonium. Analiza zawartości tych składników pozwala ustalić, czy badany płyn zawiera Bitrex, czy też płyn ten był skażony Bitrexem, a następnie został odkażony. Informacje te są bardzo przydatne przy opracowywaniu ekspertyz dla celów sądowych.