



UNIwersytet Gdański
Wydział Chemii
Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 3

**Wykrywanie benzoesu denatonium w skażonym
alkoholu etylowym metodą wysokosprawnej
chromatografii cieczowej**

Gdańsk, 2017

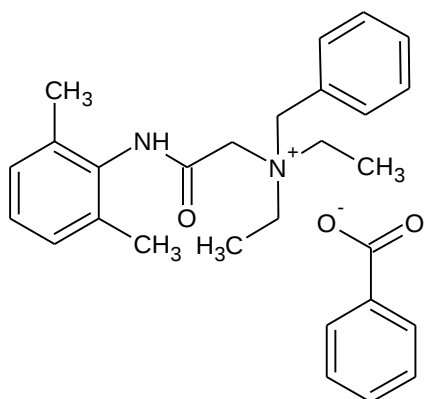
I CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest analiza benzoesu denatonium w próbkach skażonego alkoholu etylowego oraz w próbkach odkażonych przez dodanie chloranu(I) sodu (podchlorynu sodu, NaOCl). Analiza jakościowa zostanie wykonana poprzez porównanie czasu retencji analitu z czasem retencji wzorca otrzymanych w tych samych warunkach chromatograficznych.

II ODKAŻANIE ALKOHOLU

Benzoesan denatonium odkryto przypadkowo w Edynburgu w roku 1958. W laboratoriach firmy Macfarlan Smith podczas prac nad lidokainą jeden z naukowców odkrył, że otrzymany biały puder miał bardzo gorzki smak.

BENZOESAN DENATONIUM



- biały krystaliczny proszek lub granulki
- bezzapachowy ale ekstremalnie gorzki
- temperatura topnienia 163 -170 °C
- rozpuszczalność w wodzie 5% w temp. 20 °C
- może powodować reakcje alergiczne u osób uczulonych na lidokainę lub podobne związki
- nie ulega bioakumulacji
- działania kancerogennego, teratogennego czy mutagennego u ludzi nie stwierdzono

Człowiek może wykryć lekko gorzki smak benzoesu denatonium już przy stężeniu 50 ppb a bardzo gorzki smak wyczuwa przy stężeniu 1-10 ppm. Do testowania intensywności gorzkiego smaku wykorzystywani są jedynie ludzie (już od 18 miesiąca życia). W 1982 roku benzoesan denatonium został umieszczony w Księdze Rekordów Guinnessa jako „najbardziej gorzka substancja znana człowiekowi”. W 1958 roku produkt został zarejestrowany jako środek denaturujący pod marką Bitrex® w Zjednoczonym Królestwie, a w 1960 roku w Stanach Zjednoczonych. Bitrex i logo Bitrex (i wszystkie tłumaczenia) są zastrzeżone przez firmę Macfarlan Smith i nie mogą być używane ani kopiowane w żadnej formie na etykietkach, w materiałach ilustracyjnych, na opakowaniach, w reklamie czy materiałach promocyjnych bez pisemnej zgody firmy Macfarlan Smith. Warunki uzyskania zgody od firmy Macfarlan Smith to:

- przejście testów każdego produktu w laboratoriach Macfarlan Smith; pozwala na upewnienie się, że będzie on stabilny i na poziomie zapewniającym bezpieczeństwo,
- zastosowanie minimalnego poziomu Bitrex-u zapewniający gorzki smak (10 - 100 ppm),
- wszystkie prace graficzne związane z etykietkami, opakowaniami, reklamą itp. z użyciem logo Bitrex muszą być zaaprobowane przez firmę Macfarlan Smith,
- wszelkie zmiany dotyczące produktów, dla których wcześniej została uzyskana zgoda muszą być ponownie zaakceptowane przez Macfarlan Smith.

Ze względu na niestwierdzone szkodliwe działanie jest uniwersalnym środkiem do skażania produktów spirytusowych. Niestety pomimo obowiązującego prawa, wciąż pojawiają się problemy związane ze zbyt małą niż wyznaczona ilością benzoesanu denatonium w wyrobach alkoholowych oraz z usuwaniem gorzkiego smaku poprzez dodanie chloranu(I) sodu (podchlorynu sodu).

CHLORAN(I) SODU (NaOCl, podchloryn sodu)

- rozpuszczony w wodzie jest przeźroczystym żółtozielonym płynem o pH od 12 do 13, który działa silnie utleniająco
- procentowość NaOCl odnosi się do ilości czynnego chloru, maksymalnie 12,5%.

Po raz pierwszy podchloryn, najprawdopodobniej w postaci podchlorynu potasowego (KOCl), został wytworzony w XVIII wieku przez francuskiego chemika C.L. Berthollet'a. Podchloryny znalazły zastosowanie jako środki do bielenia tekstyliów i innych materiałów organicznych czy w odkażaniu ran (działa odkażająco na wszystkie drobnoustroje, grzyby i wirusy). Odkażające właściwości zadecydowały o wykorzystaniu 5% roztworu NaOCl jako środka płuczącego podczas leczenia kanałowego zębów.

Zuba i jego zespół opracowali metodę oznaczania benzoesanu denatonium za pomocą HPLC z detekcją DAD. Opracowaną metodę zastosowali także do badania efektywności usuwania benzoesanu denatonium za pomocą podchlorynu sodu. Dodatkowo wykorzystali także spektrometrię mas (zarówno w trybie pracy jonów dodatnich, jak i ujemnych). Udowodnili, że dodanie NaOCl (o zawartości 12–15% aktywnego chloru) w ilości odpowiadającej stężeniu 50 μL na litr spirytusu skażonego (3 mgL^{-1} benzoesanu denatonium) powoduje spadek stężenia jonów denatonium w roztworze. Po dodaniu NaOCl w ilości odpowiadającej 200 μL na litr alkoholu usuwa te jony całkowicie powodując zanik gorzkiego smaku przy stosunkowo niezmiennym pH roztworu. Jony benzoesanowe zniknęły dopiero po

dodaniu NaOCl w ilości odpowiadającej 80 mL na litr alkoholu. W tak otrzymanym roztworze pH osiągnęło wartość 11-12 co uniemożliwia użycie tego alkoholu dla celów konsumpcyjnych. Dzięki tym badaniom wiemy o tym, że jeśli w produkcie spirytusowym potwierdzona zostanie obecność jonów benzoesanowych to możemy przypuszczać, iż wcześniej w takim produkcie znajdował się benzoesan denatonium. Wśród zidentyfikowanych produktów degradacji benzoesanu denatonium są min. *N,N*-dibenzylamina czy chlorek sodu.

III WYKONANIE ĆWICZENIA

1. Przygotowanie próbek

Wykorzystując gotowy roztwór podstawowy benzoesanu denatonium o stężeniu równym 1000 mg/L; należy przygotować rozcieńczenia o stężeniach równych: 100; 75; 50 i 20 mg/L. Do kolb miarowych o objętości 10 mL, przeprowadzić odpowiednio: 1; 0,75; 0,5; i 0,2 mL roztworu podstawowego i uzupełnić kolbę do kreski etanolem.

Następnie należy wykonać analizę chromatograficzną (HPLC) próbek alkoholu zawierających określoną ilość benzoesanu denatonium a także próbki czystego alkoholu.

Na podstawie uzyskanych wyników, przygotować krzywą kalibracyjną.

Należy również przeprowadzić analizę otrzymanej próbki skażonego alkoholu i ocenić stężenie jonów denatonium w tej próbce na podstawie przygotowanej wcześniej krzywej kalibracyjnej.

W kolejnym etapie należy pobrać 1 ml próbki skażonego alkoholu i usunąć jony denatonium za pomocą chloranu(I) sodu (o zawartości 10–15% aktywnego chloru).

Potrzebną objętość NaOCl należy obliczyć wiedząc, że:

- A. dodanie NaOCl (o zawartości 12–15% aktywnego chloru) w ilości odpowiadającej stężeniu 50 µL na litr spirytusu skażonego Bitrexem (3 mg/L) powoduje spadek stężenia jonów denatonium w roztworze;
- B. dodanie NaOCl w ilości odpowiadającej 200 µL na litr alkoholu usuwa te jony całkowicie, co wystarczy do zneutralizowania gorzkiego smaku;
- C. jony benzoesanowe znikają z roztworu dopiero po dodaniu NaOCl w ilości odpowiadającej 80 mL na litr alkoholu.

Przy obliczeniach należy zastosować następujący wzór:

$$N = x \times (A \text{ lub } B \text{ lub } C)$$

gdzie:

N – ilość NaOCl którą należy dodać do 1 mL próbki analitycznej wyrażona w μL

x – wyznaczone stężenie Bitrexu wyrażone w mg/L (ppm)

A lub B lub C – wartości odpowiednio: 0,017; 0,067 i 26,667 stanowiące warianty neutralizacji jonów benzoesanu denatonium opisane powyżej

Następnie próbkę należy odwirować (10 min., 4000 obr./min), po czym roztwór z nad osadu przesączyć, sprawdzić pH roztworu za pomocą papierka wskaźnikowego i poddać analizie chromatograficznej.

2. Analiza HPLC

Podczas ćwiczeń zostanie wykorzystany chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym UV-Vis (SCHIMADZU SPD-20A) wyposażony w dozownik typu zaworu z pętlą o objętości 20 μL . Do analizy zostanie wykorzystana kolumna analityczna o wymiarach 150×4,6 mm (PhenoSphere-Next 5 μm C18 firmy Phenomenex). Wypełnienie stanowi żel krzemionkowy z chemicznie związanymi grupami oktadecylowymi, czyli tzw. faza odwrócona RP-18. Średnica ziaren - 5 μm . Fazą ruchomą jest mieszanina: 0,1% wodny roztwór H_3PO_4 /acetonitryl w stosunku 70:30 (v/v); rozdział izokratyczny. Prędkość przepływu fazy ruchomej: 0,7 ml/min. Czas analizy 12 minut. Maksimum absorpcji promieniowania UV jonu denatonium wynosi 205 nm natomiast jon benzoesanowy charakteryzuje się dwoma maksimumami absorpcji: około 205 i 230 nm. Pomiary stężenia benzoesanu denatonium najczęściej prowadzi się przy długości fali 210 nm.

HPLC - UWAGI OGÓLNE:

- Fazę ruchomą należy przed użyciem odgazować przez 15 min w łaźni ultradźwiękowej.
- Przed rozpoczęciem analiz należy przemyć kolumnę fazą ruchomą w ciągu minimum 30 minut aż do uzyskania stabilnej linii zerowej (przepływ 0,7 mL/min).
- Po zakończeniu analiz należy koniecznie przemyć kolumnę mieszaniną wody i acetonitrylu w stosunku 40:60 w ciągu minimum 30 minut aż do uzyskania stabilnej linii zerowej.

- Nie wolno doprowadzić do zapowietrzenia pomp poprzez zaciągnięcie powietrza przez rurki, używanie nieodgazowanych rozpuszczalników lub pozostawienie rurek, które nie są zanurzone w odpowiedniej ilości cieczy.
- Przed każdą analizą należy przemyć strzykawkę oraz pętlę dozownika kilkakrotnie rozpuszczalnikiem a następnie jednokrotnie badaną próbką.
- Dozując próbkę za pomocą strzykawki nie wolno wprowadzić do dozownika pęcherzyków powietrza.

3. Sprawozdanie

Opisać warunki przeprowadzonych analiz chromatograficznych.

Zamieścić w sprawozdaniu odpowiednio opracowane chromatogramy i krzywą kalibracyjną.

Dokonać analizy chromatogramów próbek alkoholu skażonego oraz próbek alkoholu potraktowanych chloranem(I) sodu i ocenić powstałe różnice w stężeniach analitów.

Przedstawić dyskusję wyników i wnioski.

SPRZĘT I SZKŁO LABORATORYJNE

- strzykawka do HPLC (50 μ l);
- cylinder miarowy 100 ml 2 szt.;
- pipety szklane poj. 1 ml 4 szt.;
- pipeta szklana poj. 0,2 ml 1 szt.;
- naczynka szklane poj. 4 ml 10 szt.;
- wirówka;
- próbki wirówkowe 4 szt.
- papierki wskaźnikowe;
- zestaw HPLC z detektorem spektrofotometrycznym UV-Vis.

ODCZYNNIKI

- roztwór 0,1% H_3PO_4 w 1 litrze wody wykonany poprzez rozpuszczenie 1 ml 85% H_3PO_4 w 1 litrze wody;
- faza ruchoma o składzie: 0,1% wodny roztwór H_3PO_4 /acetonitryl w stosunku 70:30 (v/v);
- faza ruchoma o składzie: woda/acetonitryl w stosunku 70:30 (v/v);
- roztwór podstawowy benzoesanu denatonium o stężeniu równym 2 mg/ml;
- roztwory benzoesanu denatonium w etanolu o stężeniach równych: 0, 5, 10, 20 i 40 mg/l;
- acetonitryl do mycia strzykawek;

- acetonitryl;
- woda dejonizowana;
- kwas octowy;
- alkohol etylowy 99,8%;
- chloran(I) sodu (NaOCl, podchloryn sodu) o zawartości 10–15% aktywnego chloru.

V Literatura:

1. D. Zuba, C. Świągoda, B. Byrska, W. Lechowicz, „Oznaczanie benzoesanu denatonium (Bitrexu) w skażonych wyrobach spirytusowych”, *Probl. Forensic Sci.*, 2005; 63:275–287.
2. Zuba D, Świągoda C, Byrska B, Lechowicz W. Ocena efektywności metody usuwania benzoesanu denatonium (Bitrexu) ze skażonych wyrobów spirytusowych za pomocą podchlorynu sodu. *Probl. Forensic Sci.* 2005; 63:288–298.
3. www.endodoncja.pl
3. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, W-wa, 1996.
4. Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, WNT, W-wa, 1995, 2005.