

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCA

2022

Erika Čillíková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Izotachoforetické stanovenie denatónia

Bc. Erika Čillíková

Diplomová práca

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Erika Čillíková**
Osobní číslo: **C19475**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Izotachoforetické stanovení denatonia**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Seznamte se se základními vlastnostmi denatonia včetně jeho výroby a využití.
2. Proveďte rešerši na téma stanovení denatonia.
3. V experimentální části prozkoumejte možnost izotachoforetického stanovení denatonia v reálných vzorcích.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martin Bartoš, CSc.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prehlasujem:

Prácu s názvom Izotachoforetické stanovenie denatónia som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, hlavne so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že ak dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorení diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernicou Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pre odovzdávanie, zverejňovanie a formálnu úpravu záverečných prác, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejnená prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa 06. 05. 2022

Bc. Erika Čillíková

POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala vedúcemu mojej diplomovej práce Ing. Martinovi Bartošovi, CSc. Za odborné vedenie, záujem, ochotu, pripomienky a čas, ktorý mi venoval počas spracovania mojej diplomovej práci.

Ďalej by som rada poďakovala mojej rodine a známym za podporu pri štúdiu.

ANOTÁCIA

Denaturácia v zmysle znehodnotenia potravín sa používa hlavne na denaturáciu alkoholu aby sa stal nevhodným na ľudskú spotrebu. Robí sa pridaním jedného či viacerých denaturačných činidiel do syntetického alkoholu.

Denaturuje sa rôznymi činidlami, z ktorých jedno je denatónium benzoát alebo Bitrex, najhorkejšia látka na svete, ktorú poznáme. Pridáva sa do množstva produktov od domácností po automobilový priemysel. V práci je prehľad metód na stanovenie tohoto denaturantu ako aj jeho stanovenie kationovou izotachoforézou.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Izotachoréza, denaturácia, denatónium benzoát, denaturovaný alkohol

TITLE

Isotachophoretic determination of denatonium

ANNOTATION

Denaturation in the sense of food degradation is also used to denature alcohol to make it unfit for human consumption. It is prepared by adding one or more denaturing agents to potable alcohol.

It is denatured with various reagents, one of which is denatonium benzoate or Bitrex, the most bitter substance known in the world. It is added to a number of products from households to the automotive industry. The paper provides an overview of the methods used to determine this denaturant as well as its determination by cationic isotachophoresis.

KEYWORDS

Isotachophoresis, denaturation, denatonium benzoate, denaturated alcohol

OBSAH

ÚVOD.....	12
1 TEORETICKÁ ČASŤ	13
1.1 Denaturácia alkoholu	13
1.2 Legislatíva.....	14
1.3 Použitie.....	15
1.4 Denatónium benzoát	15
1.4.1 História	15
1.4.2 Štruktúra	16
1.4.3 Biochémia	16
1.4.4 Toxikológia.....	17
1.4.5 Výroba	18
1.4.6 Použitie	20
1.5 Stanovenia.....	21
1.5.1 Plynová chromatografia.....	21
1.5.2 Komplexná headspace plynová chromatografia.....	21
1.5.3 Kvapalinová chromatografia	22
1.5.4 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia	22
1.5.5 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia	22
1.5.6 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia	23
1.5.7 Extrakcia v tuhej fáze a HPLC	23
1.5.8 Hydrofilná interakčná chromatografia.....	23
1.5.9 Hmotnostná spektrometria s chemickou ionizáciou za atmosférického tlaku....	24
1.5.10 Tenkovrstvá chromatografia.....	24
1.5.11 UV/Vis spektrofotometria	25
1.5.12 Plastová membránová iónovo-selektívna elektróda	25

1.5.13	Elektrochemické snímanie charakterizácia denatónivého iónu prenosom iónov na polarizovaných rozhraniach kvapalina/kvapalina	25
1.5.14	Ramanova spektroskopia	26
1.5.15	Kapilárna elektroforéza	26
2	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
2.1	Použité chemikálie	27
2.2	Prístroje a zariadenie	28
	Elektroforetický analyzátor EA 102	28
2.3	Pracovné podmienky	28
2.4	Príprava roztokov	28
2.5	Elektrolyty pre ITP analýzu	29
2.6	Príprava kalibračných roztokov denatónium benzoátu	29
2.7	Stanovenie denatónium benzoátu v modelových roztokoch	30
2.8	Príprava denatónium benzoátu na analýzu	30
2.9	Reálne vzorky	30
2.10	Príprava reálnej vzorky na analýzu	31
3	VÝSLEDKY A DISKUSIA	31
3.1	Úvodné pokusy	32
3.2	Optimalizácia krokov analýzy	33
3.3	Optimalizácia pH vedúceho elektrolytu	33
3.4	Reprodukovateľnosť	34
	Kalibračná závislosť	35
3.5	Výťažnosť metódy (analýza modelovej vzorky)	39
	Detekčný limit a medz stanovenia	40
3.6	Analýza reálnych vzoriek	40
4	ZÁVER	44
5	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	45

ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ, TABULIEK A GRAFOV

Obrázok 1: štruktúra denatónium benzoátu	16
Obrázok 2: reakcia lidokaínu a benzylchloridu.....	19
Obrázok 3: reakcia denatónium chloridu	19
Obrázok 4: reakcia denatónium hydroxidu a kyseliny benzoovej za vzniku denatónium benzoátu	20
Obrázok 5: vzorka č.1	31
Obrázok 6: izotachoforegram modelového roztoku denatónium benzoátu, dolná kolóna (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, H ⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)	32
Obrázok 7: štruktúra benzethonium chloridu.....	33
Obrázok 8: izotachoforegram modelového roztoku denatónium benzoátu s prídavkom BTH, dolná kolóna (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H ⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)	33
Obrázok 9: izotachoforegram modelovej vzorky denatónium benzoátu o koncentrácii 25 mg/l (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H ⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová).....	36
Obrázok 10: izotachoforegram modelovej vzorky denatónium benzoátu o koncentrácii 50 mg/l (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H ⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová).....	37
Obrázok 11: izotachoforegram modelovej vzorky denatónium benzoátu o koncentrácii 75 mg/l (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H ⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová).....	37
Obrázok 12: izotachoforegram modelovej vzorky denatónium benzoátu o koncentrácii 100 mg/l (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H ⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)	38
Obrázok 13: izotachoforegram vzorky denaturovaného liehu, dolná kolóna (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H ⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová).....	41

Tabuľka 1: Relatívna chuť a toxicita horkých činidiel	17
Tabuľka 2: Akútna orálna toxicita denatóniových solí.....	18
Tabuľka 3: Výsledky opakovaného merania roztoku o konc. $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l.....	34
Tabuľka 4: Výsledky opakovaného merania roztoku o konc. $1,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l.....	35
Tabuľka 5: Hodnoty metódy štandardného prídavku u vzorky denaturovaného liehu.....	38
Tabuľka 6: Hodnoty metódy kalibračnej krivky u vzorky denaturovaného liehu	39
Tabuľka 7: Hodnoty metódy kalibračnej krivky u vzorky denaturovaného liehu	39
Tabuľka 8: Správnosť metódy	40
Tabuľka 9: Detekčný limit a medz stanovenia	40
Tabuľka 10: Hodnoty metódy štandardného prídavku vo vzorke denaturovaného liehu	41
Tabuľka 11: Zistený obsah denatóniumbenzoátu vo vzorke denaturovaného liehu.....	42
Tabuľka 12: Hodnoty metódy štandardného prídavku vo vzorke denaturovaného liehu	42
Tabuľka 13: Hodnoty metódy kalibračnej krivky vo vzorke denaturovaného liehu	42
Tabuľka 14: Zistený obsah DB vo vzorke denaturovaného liehu.....	43
Graf 1: Kalibračná závislosť dĺžky zóny denatónium benzoátu na koncentrácii denatónium benzoátu vo vzorke denaturovaného liehu.....	36

ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

APCI – chemická ionizácia za atmosférického tlaku

BTH – benzetónium chlorid

CE – kapilárna elektroforéza

CFSAN – centrum pre bezpečnosť potravín a aplikovanú výživu

DB – denatónium benzoát

ECHA – Európska chemická agentúra

EOF – elektroosmotický tok

FDA – úrad pre potraviny a liečivá

FET-GC-FID – technika úplného odparovania plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom

GC-FID – plynová chromatografia s plameňovo-ionizačným detektorom

GC/MS – plynová chromatografia s hmotnostným detektorom

HILIC – hydrofilná interakčná chromatografia

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

HS-GC – headspace plynová chromatografia

LC/MS – kvapalinová chromatografia s hmotnostným spektrometrom

MEK – metyletylketón

PVP – polyvinylpyrolidón

RP-HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverznej fáze

sHS-GC-FID – komplexná headspace plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom

TLC – tenkovrstvá chromatografia

ÚVOD

Denaturácia alkoholu, je proces, ktorý robí syntetický alkohol nevhodný na ľudskú spotrebu. Taktiež takýto alkohol je oslobodený od spotrebnej dane. Pripravuje sa pridaním jedného či viacerých denaturačných činidiel do konzumného alkoholu. V rôznych krajinách sú definované postupy aj množstvá na jeho denaturáciu. Alkohol môže byť úplne alebo špeciálne denaturovaný v závislosti od použitých denaturačných činidiel. Existuje mnoho denaturačných činidiel, medzi ktoré patrí aj denatónium benzoát o ktorom je diplomová práca.

Denatónium benzoát je najviac horkou látkou na svete, je známa pod názvom Bitrex. Je to kvartérna amónna organická zlúčenina bez zápachu. Pridáva sa do širokej škály produktov, aby sa zabránilo náhodnej či úmyslenej konzumácii, od čistiacich prostriedkov do domácností po produkty v automobilovom priemysle ako aj na denaturáciu alkoholu. Už pri veľmi nízkych koncentráciách cítiť jeho horkú chuť. Považuje sa za veľmi bezpečnú zlúčeninu, pre jeho horkú chuť je nepravdepodobné, že by ho ľudia prijímali v značných množstvách.

V praktickej časti sme tiež uviedli prehľad metód na stanovenie denatónium benzoátu, ako v experimentálnej časti jeho stanovenie izotachoforézou v kationovom režime v jednej vzorke ktorou bol technický lieh denaturovaný.

1 TEORETICKÁ ČASŤ

1.1 Denaturácia alkoholu

Je to proces, ktorý robí alkohol nevhodným na ľudskú spotrebu zmenou chuti, vône a/alebo vzhľadu [1; 2]. V zmysle znehodnotenia potravín sa tiež denaturuje soľ a cukor, ktorý sa používa na kŕmenie zvierat [3]. Denaturovaný alkohol molekulu alkoholu chemicky nemení ani nerozkladá. Daňová sadzba pre denaturovaný alkohol je oveľa nižšia ako na konzumný alkohol [2].

Denaturovaný alkohol alebo denaturovaný etanol je pripravovaný pridaním jedného či viacerých denaturačných činidiel do konzumného alkoholu, čoho robí nevhodným na konzumáciu či vnútorné použitie v humánnej medicíne. Alkohol môže byť úplne alebo špeciálne denaturovaný v závislosti od typu použitých denaturačných činidiel. Každý zo špeciálne denaturovaného alkoholu sa pripravuje zmiešaním etanolu s množstvom širokej škály denaturačných činidiel [1].

Kódex federálnych predpisov USA špecifikuje mnoho povolených denaturačných činidiel, z ktorých je bežne používaný metanol, ktorý zvyčajne tvorí 4% alebo 5% prímiesí, ďalej sú často používané činidlá ako metyletylketón (MEK), izopropanol a denatónium benzoát. Metyletylketón a izopropanol sa pridávajú, aby alkohol zapáchal, zatiaľ čo denatónium benzoát je používaný na veľmi horkú chuť. Vlastnosti alkoholu sa môžu meniť, ak sa denaturačné látky pridávajú vo vyšších množstvách, ako je potrebné na denaturáciu [2].

Denatónium benzoát sa samotne nepoužíva ako denaturačné činidlo v etanole, ale zahrnuté v zmesi rôznych denaturačných činidiel. V USA je táto zlúčenina prítomná ako prísada v dvoch schválených formuláciách špeciálne denaturovaného alkoholu (SDA), SDA-I a SDA-40B. SDA-I a SDA-40B obsahujú denatónium benzoát v konečnej hodnote 11 ppm a 6 ppm [4; 5]. Tieto alkoholy sú používané ako rozpúšťadlá v mnohých kozmetických a spotrebiteľských výrobkoch [5].

Je známe, že niektorí alkoholicy zámerne konzumujú výrobky obsahujúce denaturovaný alkohol ako náhradu za nápoje obsahujúce etanol. Niektoré krajiny zakázali používanie metanolu ako denaturačného činidla z dôvodu zdravotného rizika, ktoré táto prax predstavuje. Ako bolo uvedené vyššie, denatónium benzoát je prísada do niektorých automobilových nemrznúcich zmesí, slúžiaca ako averzívne činidlo [6].

1.2 Legislatíva

Európske nariadenie pre úplnú (všeobecnú) denaturáciu liehu

Nariadenie komisie (ES) č. 3199/93, v znení Vykonávacieho nariadenia komisie (EÚ) 2018/1880 z 30. novembra 2018 o vzájomnom uznávaní postupov úplnej denaturácie liehu na účely oslobodenia od spotrebnej dane stanovuje denaturačné prostriedky, ktoré používajú jednotlivé členské štáty na úplnú (všeobecnú) denaturáciu liehu. Lieh denaturovaný podľa tohoto nariadenia možno tiež voľne dovážať/ vyvážať z/ do ostatných členských štátov [7].

Denaturačné prostriedky, ktoré používajú jednotlivé členské štáty na úplnú denaturáciu liehu podľa čl. 27 odst. 1 písm. a) smernica 92/83/EHS, sú uvedené v prílohe nariadenia komisie (ES) č. 3199/93 [7].

Zoznam produktov ktoré sú povolené na úplnú denaturáciu liehu: acetón, denatónium-benzoát, etanol, terc-butyl(etyl)éter, fluoresceín, benzín (vrátane bezolovnatého benzínu), izopropylalkohol, petrolej, olej do lúčnic, metanol, etyl(metyl)ketón (2-butanon), metyl(izobutyl)ketón, metylenová modrá (52015), solventná nafta, terpentýnový olej, technický benzín [7].

Vo všetkých členských štátoch môže byť ku denaturovanému liehu pridané farbivo, aby získal charakteristickú farbu, vďaka ktorej je okamžite rozpoznateľný [7].

Spoločný postup denaturácie pre úplne denaturovaný lieh používaný v Belgicku, Bulharsku, Českej republike, Dánsku, Nemecku, Estónsku, Írsku, Grécku, Španielsku, Francúzsku, Taliansku, na Cypre, v Lotyšsku, Litve, Luxembursku, Maďarsku, na Malte, v Holandsku, Rakúsku, Poľsku, Portugalsku, Rumunsku, Slovinsku, na Slovensku a vo Fínsku: na jeden hektoliter absolútneho etanolu: 1,0 litru izopropylalkoholu, 1,0 litru etyl(metyl)ketónu, 1,0 gramu denatónium benzoátu [7].

Ďalší postup denaturácie pre úplne denaturovaný lieh používaný v Českej republike: na jeden hektoliter absolútneho etanolu: 0,4 litru solventnej nafty, 0,2 litru petroleja, 0,1 litru technického benzínu [7].

Výraz „absolútny etanol“ tu má rovnaký význam ako výraz „čistý alkohol“ používaný medzinárodnou úniou pre čistou a použitú chémiu. Zloženie denaturovaného alkoholu(etanolu) je prísne definované vládnymi nariadeniami, ktoré sú v jednotlivých krajinách odlišné [7].

1.3 Použitie

Kozmetika

Denaturovaný alkohol sa používa ako odpeňovač, kozmetický adstringent, rozpúšťadlo a činidlo znižujúce viskozitu v kozmetike a všetky špeciálne denaturované alkoholy fungujú ako kozmetické adstringenty, rozpúšťadlá a látky znižujúce viskozitu. V USA ako aj v Európe bývajú denaturačné činidlá regulované. Denaturovaný alkohol nie je zaradený medzi látky uvedené ako zakázané, obmedzené alebo dočasne povolené v používaní kozmetických výrobkov predávaných v Európe alebo v Japonsku [1].

Nekozmetické prípravky

Denaturovaný alkohol je používaný v lekárskech, priemyslových prostriedkoch a prostriedkoch do domácnosti. Hoci FDA/CFSSAN zaradil denaturovaný alkohol ako jednu z prídavných látok v potravinách v kategórii „Všetko, čo sa pridáva do potravín v USA“ (EAFUS), nie je hlásené jeho použitie ako prídavnej látky v potravinách [1].

1.4 Denatónium benzoát

Denatónium benzoát (obchodný názov Bitrex®, Denatrol, Aversion, BITTERANT-b či BITTER+PLUS) je jednou z najviac horkých látok na svete aké človek pozná [6; 8]. Je pridávaný do širokej škály produktov v požadovaných nízkych množstvách tak, aby nenarušal spôsob účinku výrobku [1]. Vo veľkej miere býva používaný na prevenciu náhodnej či úmyselnej konzumácie veľkého množstva toxických produktov, ako sú čistiace prostriedky, automobilové výrobky, ako aj zdravotné či kozmetické výrobky [9 - 13]. Okrem toho je bežne používaný na denaturáciu alkoholu, ktorý nie je zdaňovaný ako alkoholický nápoj [9]. Je komerčne dostupný vo forme bieleho prášku, ale sú k dispozícii aj granule alebo roztoky denatónia [1].

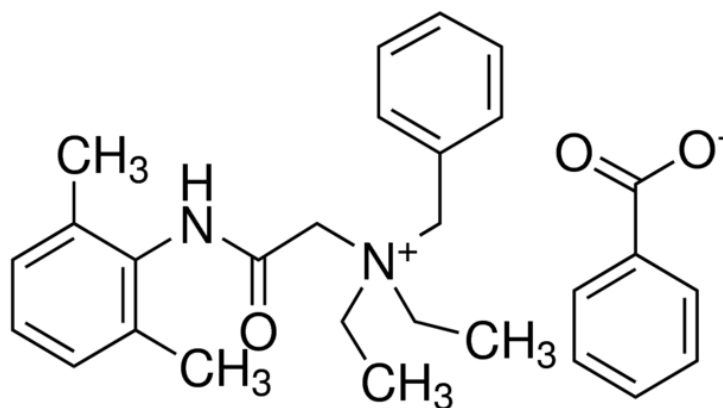
1.4.1 História

Denatónium benzoát bol objavený náhodne v roku 1958 W. Barnesom pri hľadaní silnejšieho lokálneho anestetika [8; 13]. Vyrába a predáva ho spoločnosť Macfarlan Smith Ltd., v Spojenom kráľovstve [11] pod značkou Bitrex® [8; 11; 13 - 15]. Prvá známa aplikácia Bitrexu bola ako averzant u ošípaných, ktoré kanibalizovali svoje vlastné chvosty alebo chvosty iných ošípaných [8; 13]. Ako denaturačné činidlo v liehu bol prvýkrát použitý v 70. rokoch 20. storočia [13; 16].

1.4.2 Štruktúra

Je to netoxický, chemický stabilný a príbuzný derivát lidokaínu (obrázok 1) [14; 17]. Jeho molekulový vzorec je $C_{28}H_{34}N_2O_3$ a úplný chemický názov N-benzyl-2-(2,6-dimetylanilino)-N,N-dietyl-2-oxoetán-1-amínium-benzoát [11; 13]. Je to kvartérna amónna organická zlúčenina [1; 4; 18] s molekulovou hmotnosťou 446,58 g/mol. Je to biela kryštalická látka bez zápachu. Bod topenia sa pohybuje od 163 do 170 °C. Je rozpustný vo vode a alkohole, čiastočne v acetóne a takmer nerozpustný v éteri. Absorbčné maximum je pri 263 nm pretože má veľmi široký absorpčný pás a absorbuje od cca 280 nm ku kratším vlnovým dĺžkam. pH 3% vodného roztoku sa pohybuje medzi 6,5 a 7,5. Jeho disociačná konstanta $pK_a = 4,05$ [2].

Lignokaín benzylbenzoát a lidokaín benzylbenzoát sú synonymá pre denatónium benzoát. Chemicky je podobný prírodným horkým látkam ako je chinín, v tom, že má molekulárnu štruktúru s oddelene nabitými prvkami, ktoré pôsobia na chuťové receptory [1].



Obrázok 1: štruktúra denatónium benzoátu [19]

1.4.3 Biochémia

Denatónium benzoát je viazaný na špecifické formy proteínov receptora horkej chuti (TAS2R), ktoré sú na jazyku. TAS2R sú exprimované tiež v tkanivách ako je mozog, GIT trakt a pľúca. TAS2R sú receptory viazané na G-proteíny, ktoré po aktivácii v konečnom dôsledku spôsobujú uvoľňovanie vápnika z vnútrobunkových zásob. Fyziologické účinky tohto uvoľňovania vápnika sú odlišné v závislosti od typu tkaniva a expresii TAS2R [4].

Vnímanie horkej chuti u človeka je zistiteľné už pri koncentráciách 10 ppb, 50 ppb pre výrazne horkú chuť a nepríjemne horkú pri 10 ppm [1; 4; 11; 16; 18]. Bežný rozsah použitia je 6-50 ppm, v závislosti od druhu výrobku, do ktorého je pridávaný [11]. Pre účely denaturácie

alkoholu, denatónium benzoát je pridávaný v množstve 6ppm v USA a 10 ppm vo Veľkej Británii. Vo väčšine ostatných aplikácií je 20 až 50 ppm odporúčaná koncentrácia na to, aby bol prípravok averzívne horký, hoci je používaných až 100 ppm [1]. V závislosti od použitia, koncentrácie medzi 200-300 mg/l či 20-100 mg/l sú používané v repelentoch pre zvieratá alebo na prevenciu pred náhodným požitím človekom, zatiaľ čo bežný postup denaturácie alkoholu v Európskej únii vyžaduje 10 mg/l denatónium benzoátu [6].

1.4.4 Toxikológia

Táto averzívna látka je vo všeobecnosti považovaná za veľmi bezpečnú zlúčeninu, pretože štúdie na zvieratách naznačujú že nie je karcinogénna, genotoxická ani mutagénna [6; 11]. Vykazuje miernu akútnu orálnu toxicitu pre rôzne druhy cicavcov so strednými letálnymi dávkami v rozmedzí 593-865 mg/kg. Pre jeho nepríjemnú horkosť je nepravdepodobné, že by ho ľudia prijímali v značnom množstve (tabuľka 1) [6].

V súlade s jeho používaním bolo denatónium identifikované ako mikropolutant v životnom prostredí prenášaný odpadovými vodami, pričom v povrchových vodách dosahuje koncentrácie až 400 ng.l⁻¹. Akútne toxické účinky pre vodné druhy možno pri takýchto nízkych koncentráciách zanedbať, pretože stredné letálne koncentrácie pre vybrané bezstavovce a pstruha dúhového sa pohybuje v rozmedzí 400 až 1000 mg.l⁻¹ [14].

Štúdie toxicity na zvieratách naznačujú nízky profil toxicity pre denatónium benzoát (tabuľka 2), ale údaje týkajúce sa chronickej toxicity a potenciálu precitlivenosti pre človeka sú obmedzené [11; 17]. K opakovanému neúmyselnému vystaveniu obyvateľstva dochádza prostredníctvom rôznych spotrebných produktov, ako sú opaľovacie krémy, kozmetické výrobky a čistiace prostriedky pre domácnosť. Nežiaduce účinky na tieto expozície by bolo ťažké rozoznať vzhľadom na to, že DB nie je uvedený na väčšine produktov z dôvodu nízkeho percentuálneho obsahu [11].

látka	prah [ppm]	relatívna horkosť	ústna LD ₅₀ [mg/kg]
denatóniumsacharid	0,01	1000	1430
denatóniumbenzoát	0,05	500	612
denatóniumchlorid	0,1	100	820
oktaacetátsacharózy	10	1	5000 ¹
quassin	16,7	0,67	800
brucín	4,5	2,2	1
kvercetín	50	0.2	2000 ²
naringenín	65	0,15	údajene dostupné

Relatívna horkosť je horkosť látky v porovnaní s oktaacetátom sacharózy.

Prah je koncentrácia zistená u 50% testovaných dospelých osôb.

Ústna LD₅₀ je stredná letálna dávka pre albínskych potkanov.

¹Žiadne zviera neuhynulo pri najvyššej testovateľnej koncentrácii 5000 mg/kg.

²Po perorálnych dávkach 2000 mg/kg/deň počas deviatich dní neuhynuli žiadne zvieratá.

Tabuľka 2: Akútna orálna toxicita denatóniových solí [5]

druh	LD ₅₀ [mg/kg] ¹	
	denatónium sacharid	Denatónium benzoát
myš	1232	865
potkany	1430	612
novorodenecké potkany	23	údaje nedostupné
morčatá	1300	805
krevety	600 ²	400 ²
pstruh dúhový	1500 ²	1000 ²
králiky	1390	593

¹LD₅₀ je stredná orálna letálna dávka.

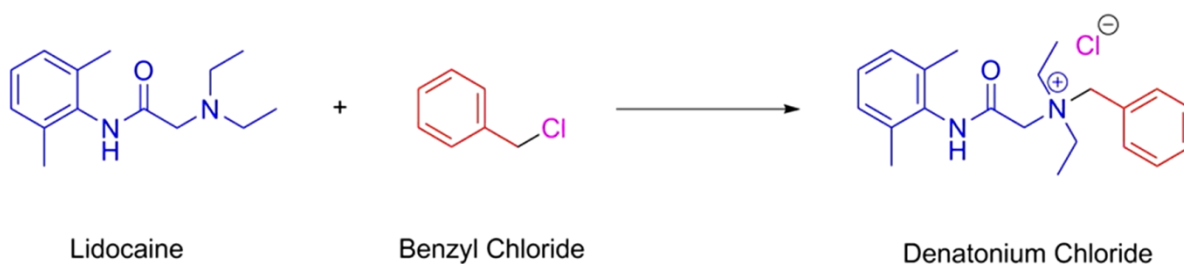
²Tieto hodnoty sú stredná letálna koncentrácia v mg/l.

1.4.5 Výroba

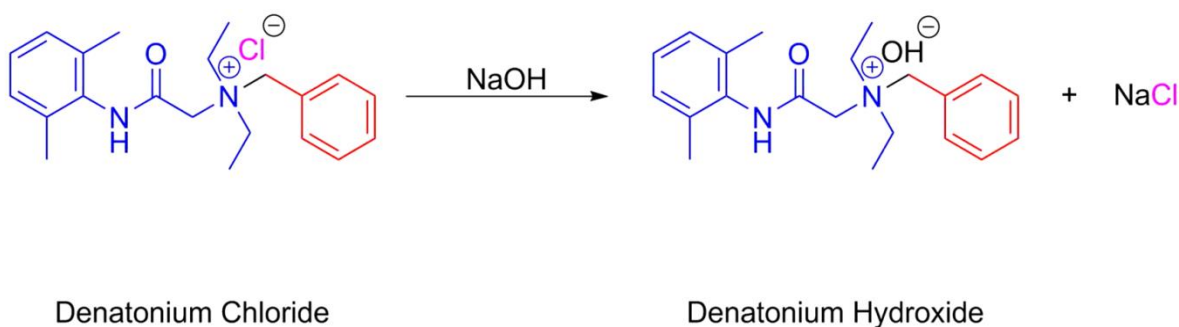
Známa je výroba denatónium benzoátu alebo príbuzných kvartérnych solí, vychádzajúc z denatónium chloridu. Napríklad patent GB 955 309 uvádza spôsob syntézy kvartérneho amónium benzoátu zahŕňajúceho denatónium chlorid, kde sa denatónium chlorid najskôr pripraví reakciou lidokaínu s benzylchloridom (obrázok 2) v organickom rozpúšťadle a potom sa uvedie do kontaktu s alkoholovou žieravou zásadou alebo iónomeničovou živicom v hydroxidovej forme za vzniku denatónium hydroxidu (obrázok 3). Tento medziprodukt

sa pomocou kyseliny benzoovej a metanolu premení na denatónium benzoát (obrázok 4) alebo príbuzné soli [20].

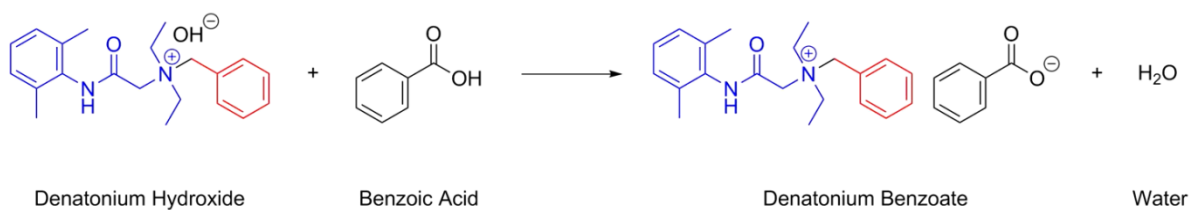
Z GB 955 309 sa vo všeobecnosti rozumie, že kvalita kvartérnej denatóniovej soli, ako je denatónium benzoát, je do značnej miery určená čistotou východiskového materiálu, čiže denatónium halogenidu. Aby vznikla kvartérna amóniová soľ, ktorá spĺňa špecifikácie USP, denatónium halogenid bol najskôr podrobený izolácii a purifikačným krokom zahŕňajúcim vákuovú destiláciu v organickom prostredí a odstredenie alebo kryštalizáciu, predtým ako bol premenený na hygroskopický a nestabilný medziprodukt hydroxidu denatónia. V GB 955 309 je uvedené, že kvartérny hydroxid bol najlepšie používaný v organickom rozpúšťadle, v ktorom bol pripravovaný, aby bola vyrobená finálna kvartérna amóniová zlúčenina, ktorá je predmetom záujmu. Bolo zistené, že čistota hydroxidovej formy má priamy vplyv na kvalitu konečného produktu, ktorý má byť pripravený z tejto zlúčeniny, ale že kvartérny hydroxid amónny bol izolovaný oveľa priamočiarejšie ako forma halogenidu, a to aj napriek upozorneniam na nestabilitu hydroxidu uvedenú v GB 955 309 [20].



Obrázok 2: reakcia lidokaínu a benzylchloridu [21]



Obrázok 3: reakcia denatónium chloridu [21]



Obrázok 4: reakcia denatónium hydroxidu a kyseliny benzoovej za vzniku denatónium benzoátu [21]

1.4.6 Použitie

Denatónium benzoát (Bitrex®) používajú ako horkú averzívnu prísadu výrobcovia automobilových produktov na báze etylénglykolu a metanolu na zmiernenie nebezpečenstva pred náhodným alebo úmyselným požitím týchto prípravkov [14].

Vďaka svojej intenzívnej horkej chuti a netoxicity je komerčne využívaný v prostriedkoch proti cmúľaniu palcov ahryzeniu nechťov, na denaturáciu čistiacich prostriedkov, dezinfekčných prostriedkov, pracích prostriedkov a ďalších, aby bolo zabránené náhodnému či úmyselnému požitiu týchto produktov [11; 15; 18]. Je aplikovaný tiež ako repelent natieraný na kôru stromov alebo ako prípravok na namáčanie rastlín na odstrašenie jeleňov a iných cicavcov poškodzujúcich listnané a ihličnaté stromy [22].

Bitrex bol vyvinutý ako rôzne repelenty pre zvieratá, ako sú repelenty pre mačky, psy a vtáky, na prevenciu kanibalizmu u ošípaných (prasiat), aby kone nežuli ich stajne a ježkovia nejedli granule proti slimákom [11].

Najčastejšie je však denatónium benzoát používané na denaturovanie alkoholu, čím sa stáva nevhodným na ľudskú spotrebu [1; 4; 12; 17] a je oslobodený od ciel, ktoré sa bežne vzťahujú na alkohol [5; 8]. Legálne je povolené v mnohých krajinách, vrátane USA, ako denaturačné činidlo. Niektoré jurisdikcie, vrátane niektorých štátov v USA, vyžadujú prídanie denatónium benzoátu do automobilových nemrznúcich zmesí [6].

Hoci chýbajú podrobné informácie o ročnej celosvetovej produkcii tejto zlúčeniny, podľa najnovšej správy Európskej chemickej agentúry (ECHA) sa spotreba tohto averzívneho činidla v EÚ odhaduje na približne 100 – 1000 ton ročne [8; 9; 14; 22].

Príbuzná látka, denatónium sacharid, sa predáva ako sprej na odpudzovanie zvierat (zvierací repelent) pod názvom ROPEL a má všeobecné tvrdenia o účinnosti proti psom, mačkám, mývalom, čajkám, potkanom, veveričkám a ďalším zvieratám. Je navrhovaný

na postrek odpadkov a kontajnerov na odpadky, aby bolo týmto zvieratám zabránené rabovaniu odpadkov [11].

1.5 Stanovenia

1.5.1 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia (GC) bola použitá na analýzu Bitrexu v rôznych kanadských denaturovaných alkoholových formuláciách. Vzorky boli nadávkované do GC injektora, kde došlo ku tepelnému rozkladu Bitrexu a bola urobená následná analýza preskupného produktu pyrolýzy, ktorý bol najviac štruktúrou podobný Bitrexu. Na jeho kvantifikáciu bola použitá GC/MS odozva v režime SIM (režim monitorovania iónov). Tiež boli stanovené aj iné denaturačné činidlá ako je gáfor, dietylftalát (DEP) a oktaacetát sacharózy (SOA). Boli stanovené ich možné matricové účinky, ktoré mohli mať vplyv na kvantifikáciu Bitrexu, sériou štandardných alkoholových roztokov obsahujúcich 16 ppm Bitrexu. Bolo zistené, že najväčší vplyv mal oktaacetát sacharózy, preto pre presné určenie Bitrexu vo vzorke obsahujúcej SOA bolo nutné zosúladiť maticu kalibračných roztokov s maticou vzorky. Ako nosný plyn bolo použité hélium [23].

1.5.2 Komplexná headspace plynová chromatografia

Je to technika úplného odparovania vzorky v kombinácii s plynovou chromatografiou a FID detekciou na stanovenie prchavých aj neprchavých denaturačných látok v denaturovanom etanole v dezinfekcii a kvapalinách do ostrekovačov. Toto stanovenie bolo založené na metóde priameho vstrekovania, pri ktorom sa denatónium benzoát rozkladal ako na prchavé molekuly, tak na neprchavé. Na stanovenie kvartérnych amóniových solí, ako je denatónium benzoát, vo vodných vzorkách metódou GC boli vzorky obohatené 2,2-dimetoxypropánom (DMP), ako zachytávačom vody, s použitím HCl ako katalyzátorom. Vznikol etanol, metanol a acetón, ktoré boli pomerne prchavé a boli odstránené vakuovým odparovaním. Okrem zachytávania vody boli rozkladané aj kvartérne amónne soli. V prípade denatónium benzoátu vznikol prchavý benzylchlorid, ktorý bol po zahriatí HS liekovky odparený. Vzhľadom k tomu, že metóda sHS-GC-FID bola náchylná na matricové efekty a nebolo možné ňou určiť denatónium benzoát, bola preferovaná metóda FET-GC-FID. Táto technika poskytuje priamy prístup na analýzu etanolu a prchavých denaturačných činidiel, ako je metyletylketón a izopropanol, ako aj denatónium benzoát. Hodnoty výťažnosti u prchavých látok sa pohybovali medzi 99,1%

a 101,7%. Medz detekcie bola 0,035 μg DB na HS liekovku a medz kvantifikácie 0,10 μg /HS liekovka DB. Citlivosť bolo možné zvýšiť použitím vyšších objemov vzoriek až do 5 ml, pričom limit detekcie bol 0,007 ppm [24; 25].

Izopropanol a metyletylketón (MEK), ktoré sú prchavými denaturačnými látkami, boli ľahko analyzované pomocou plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom (GC-FID) buď s priamym vstreknutím alebo dávkovaním vzorky technikou headspace. Uprednostňovaná bola však headspace technika, pretože vzorky etanolu (zvyčajne 70% v/v) často obsahujú veľké percento vody, čo mohlo spôsobiť preťaženie injekčnej vstrekovacej vložky [24;25].

1.5.3 Kvapalinová chromatografia

Kvapalinovou chromatografiou sa kvantifikoval Bitrex v komerčne dostupných produktoch pre domácnosť. Boli analyzované štyri rôzne komerčne dostupné vzorky obsahujúce denatónium benzoát, vrátane alkoholového riedidla a zimných/letných kvapalín do ostrekovačov čelného skla [26].

Ide o metódu deutériového značenia denatónium benzoátu (Bitrex) prostredníctvom H/D výmeny (HDX) jeho α -uhlíkových vodíkových atómov v CH_2 skupine umiestnenej medzi karbonylovou a kvartérnou amóniovou skupinou. Cieľom bolo získať α -C deuterovaný analóg denatóniového kationu a analyzovať ich použiteľnosť pri kvantitatívnej analýze vzoriek obsahujúcich denatónium benzoát po derivatizácii, po ktorej nasledovala LC/MS analýza [26].

1.5.4 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Touto metódou bol stanovený denatónium benzoátu v niekoľkých formuláciách denaturovaného alkoholu z Litvy. Vzorky denaturovaného etanolu a kvapalín do ostrekovačov čelného skla boli analyzované bez predošlej úpravy. Na analýzu bol použitý UV detektor s vlnovou dĺžkou 210 nm. Pík matrice vzorky bol prekrytý s píkom analytu, takže bolo potrebné riedenie vzoriek na odstránenie vplyvov matrice. Kolóna bola použitá nemoifikovaný oxid kremičitý. Ako mobilná fáza sa použila 55% CH_3OH a 45% 0,05 mol/l Na_2HPO_4 , pH 6,5. Prietok mobilnej fázy bol 0,5 ml/min [10].

1.5.5 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Metóda bola použitá na stanovenie denatónium benzoátu v spotrebiteľských produktoch z Oregonu ktorými boli štyri nemrznúce prípravky, šesť kvapalín do ostrekovačov, tri

kozmetické a čistiace prostriedky, tiež ďalších osem nemrznúcich produktov a 14 kvapalín do ostrekovačov čelného skla. Ako kolóna bola použitá C₁₈ s oktadecylovými skupinami chemicky viazanými na mikročastice oxidu kremičitého. Mobilná fáza pozostávala zo zmesi acetonitril-voda (60:40) obsahujúca 0,01 mol/l chloridu sodného. Prietok bol 1,2 ml/min, vstrekaný objem vzorky bol 10 µl a elučné činidlo z kolóny bolo monitorované pri 210 nm [27].

1.5.6 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Analytická metóda na stanovenie denatónium benzoátu v etanole s 5% polyvinylpyrolidónom bola vyvinutá pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie na iónových pároch s reverznou fázou s ultrafialovou detekciou s vlnovou dĺžkou 210 nm. Detektor fotodiodového poľa. Na optimalizáciu separácie a citlivosti prípravku Bitrex boli skúmané fyzikálno-chemické vlastnosti tejto zlúčeniny. Keďže Bitrex je kvartérna amóniová soľ kyseliny benzoovej, jej hydrofilný charakter bol v rámci funkcie pH nezmenený. Keďže molekula denatónia obsahuje hydrofóbne skupiny, kladne nabitý kvartérny amín spôsobuje nízku retenciu v podmienkach reverznej fázy. V dôsledku toho bola iónovou chromatografiou hodnotená mobilná fáza s nízkym pH aby bola zvýšená retencia denatónia a zároveň bolo dosiahnuté oddelenie od PVP. Vzorky s Bitrexom v etanole s 5% PVP reagovali s iónovým párovým činidlom aby bola zvýšená retencia denatónia na oddelenie Bitrexu od PVP a detekcia bola uskutočnená detektorom s fotodiodovým poľom [28].

1.5.7 Extrakcia v tuhej fáze a HPLC

Metóda izolácie a kvantitatívneho určenia Bitrexu. Je založené na využití extrakcie pevnej fázy (jednoduchý a účinný postup) v spojení s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou na reverznej fáze (RP-HPLC). Separácia bola urobená na stĺpcoch s rôznymi stacionárnymi fázami (oktadetyl, alkylamid a kyano). Bola urobená extrakcia, ktorá je kombináciou SPE kolóny naplnenej silikagélom (SiOH) a kyano (CN) fázy. Bol použitý UV-Vis detektor. Pri všetkých chromatografických vyšetreniach bol prietok 1 ml/min [29].

1.5.8 Hydrofilná interakčná chromatografia

Hydrofilná interakčná chromatografia (HILIC) bola použitá na stanovenie bežných denaturantov (denatónium benzoát, kryštálová violet' a metylénová modrá) v rôznych formuláciách denaturovaného alkoholu z Litvy. Boli použité tri komerčne dostupné kolóny predstavujúce rôzne polárne stacionárne fázy (aminopropyl, kyanoetyl a oxid kremičitý). Testovacia zmes analytov bola skúmaná za použitia konvenčnej HILIC mobilnej fázy (90:10

acetonitril/voda obsahujúca 10 mmol/l chloridu amónneho). Detekcia bola UV pri 220 nm. Výsledky ukazujú že HILIC pomocou polárnej SF ponúka atraktívnu alternatívu k HPLC s reverznou fázou na stanovenie kladne nabitých analytov. Jednoduché acetonitrilovo-vodné mobilné fázy môžu byť použité na udržanie polárnych podmienok zlúčeniny, pričom bolielouvané nepolárne zlúčeniny relatívne rýchlo a následne, aby bolo predídene problémom s tým spojenými s interferenciami matrice vzorky [30].

1.5.9 Hmotnostná spektrometria s chemickou ionizáciou za atmosférického tlaku

Metóda bola použitá na detekciu a stanovenie Bitrexu a dietylftalátu v alkohole. Hmotnostné spektrá kladných iónov APCI boli zaznamenané na jedno-kvadrupólovom spektrometri. APCI patrí medzi najobľúbenejšie ionizačné techniky na analýzu neprchavých organických zlúčenín tu študovaného typu. Za popísaných podmienok MS s APCI priamym vstrekom prietoku umožnila simultánnu identifikáciu a určenie Bitrexu a dietylftalátu v etanole. Vzorka nemusela byť upravovaná a použitie techniky prietokového vstrekovania znamenalo, že analýza bola priama a prakticky okamžitá. MF bola acetonitril/voda (prietok 1 ml/min). Zlúčeniny boli identifikované z ich celkových iónových chromatogramov (m/z 50-500) a súčasne kvantifikované pomocou vybraných iónových chromatogramov zaznamenaných pri m/z 223 pre dietylftalát a m/z 325 pre Bitrex [31].

1.5.10 Tenkovrstvá chromatografia

Soli denatónia boli oddelené iónovou výmenou na karboxymetylcelulóze a určujú sa pomocou tenkovrstvej chromatografie, ktorá oddeľuje aj iné kvartérne zlúčeniny amoniaku. Bola použitá na stanovenie vzoriek, kde je nutné odlišiť vzorky obsahujúce požadovanú koncentráciu 2 mg od vzoriek obsahujúcich výrazne nižšie koncentrácie. U denaturačných látok je mnoho pravdepodobných zložiek rozpustnejších v etanole než vo vode či chloroforme. Účinnosť separácie medzi iónovou výmenou bola meraná titráciou 0,1% etanolového roztoku kvartérnych zlúčenín amoniaku s roztokom tetrafenylboronu sodného pred separáciou a po nej [32].

Stupeň oddelenia iných kvartérnych amóniových zlúčenín od denatónia bol testovaný na tenkovrstvých chromatografických platniach naplnených rôznymi anorganickými soľami, kde boli výsledky vyhodnotené vizuálne. Určitý úspech bol dosiahnutý adsorpciou denatónia na metakrylový typ kationového výmenníku a následnou desorpciou. Zistili sme, že DB bol neúplne adsorbovaný z 95% etanolového roztoku. Pri premene na hydroxid priechodom cez

aniónomeničovú živicu, vo forme hydroxidu, bolo denatónium účinne adsorbované karboxymetylcelulózou [32].

1.5.11 UV/Vis spektrofotometria

Metóda bola použitá na stanovenie jednotlivých zložiek Talianskeho všeobecného denaturačného činidla vo vzorkách alkoholu. Bol analyzovaný denatóniumbenzoát, tiofén, metyletylketón a C.I. reaktívne červené farbivo 24 a koncentrovaná štandardná denaturačná zmes. Ďalej bolo analyzovaných 14 komerčných vzoriek denaturovaného alkoholu na dezinfekciu pokožky rôznych značiek. Na identifikáciu a kvantifikáciu denatónium benzoátu boli vzorky najskôr extrahovali CHCl_3 , po reakcii organickej fázy s disulfínovou modrou bolo zaznamenané viditeľné spektrum a bola meraná absorbanca pri 640 nm. Ostatné 3 zložky (farbivo, tiofén a MEK) boli stanovené vo vzorkách priamo bez predbežnej úpravy [33].

1.5.12 Plastová membránová iónovo-selektívna elektróda

Metóda extrakcie denatónium benzoátu z olejov bola modifikovaná pre potenciometrické stanovenie denatónium benzoátu. Na stanovenie denatóniového iónu na báze denatóniovej soli tetrafenylborátu bola použitá poly(vinylchloridová) matricová membránová iónovo selektívna elektróda (ISE). ISE elektróda bola použitá tiež na titračné stanovenie niekoľkých kvartérnych zlúčenín amoniaku za použitia tetrafenylboritanu sodného ako titrantu. Vzorky repkového oleja boli extrahované vodou a obsah denatónium benzoátu bol stanovený z kalibračného grafu. Ako referenčná elektróda na meranie potenciálu bola použitá dvojojzvodová elektróda typu Ag-AgCl s 10% NaNO_3 ako spojovacím materiálom [34].

1.5.13 Elektrochemické snímanie charakterizácia denatóniového iónu prenosom iónov na polarizovaných rozhraniach kvapalina/kvapalina

Stanovenie elektroanalytickou metódou na detekciu a kvantifikáciu denatónium benzoátu vo vodných vzorkách. Metóda je založená na prenose kationu denatónia cez mikroporéznu membránu oddeľujúcu vodný roztok a organický roztok 1,2-dichlóretánu. Bola použitá square-wave voltampérometria a chronoamperometria na kvantifikáciu a charakterizáciu denatóniového iónu (N-benzyl-2-(2,6-dimetylfenylamino)-N,N-dietyl-2-oxoetánamínium) vo vodných vzorkách [9].

1.5.14 Ramanova spektroskopia

Ramanovou spektroskopiou bola stanovená rýchla detekcia zvyškov denatónium benzoátu v podozrivých alkoholických nápojoch. Táto metóda navrhovala prenosný Ramanov spektrometer o excitačnej vlnovej dĺžke 785 nm a využívala efekt Ramanovej spektroskopie s vylepšeným povrchom (SERS) na rozpoznanie podozrivých alkoholických nápojov. Ramanova spektroskopia umožňovala rýchle a jednoduché detekcie alkoholických nápojov, ktoré boli znečistené niektorými zvyškami Bitrexu. Boli skúmané rozdiely medzi čistým etanolom, etanolom denaturovaným Bitrexom a ošeterný chlornanom sodným. Metóda navyše zahrievala skúmanú vzorku kvapaliny laserovým svetlom a indukovala rýchle odparovanie etanolu, ktorého charakteristická línia spektra mizla zo zaznamenaného spektra, čo zvyšovalo koncentráciu zvyškov Bitrexu, aby bola zaistená správna detekcia [35].

1.5.15 Kapilárna elektroforéza

Kapilárnou elektroforézou (CE) bol analyzovaný denatónium benzoát v niekoľkých formuláciách denaturovaného alkoholu z Litvy. V dôsledku nízkej pohyblivosti iónu denatónia bol použitý elektrolytový kation s miernou pohyblivosťou. Vzhľadom k tomu, že denatóniový kation vykazuje významnú absorpciu v rozsahu UV žiarenia, bol použitý priamy režim detekcie UV žiarenia pri 214 nm. Na skúmanie vplyvu rôznych kationov na separačný účinok boli v nosnom elektrolyte použité kationy etyléndiamín (En), trietanolamín (TEA) a Tris, ktoré mali mobility blízke mobilite denatóniovému kationu. Boli porovnané migračné časy týchto troch kationov a účinnosť denatóniového kationu. Experimenty boli robené v elektrolyte obsahujúcom 25 mmol/l H_3PO_4 neutralizované vhodnou zásadou do pH 7. Z troch elektrolytov mal najnižší migračný čas Tris, o niečo vyššiu hodnotu mal trietanolamín, naopak etyléndiamín mal dobu migrácie analytu takmer dvakrát dlhšiu, pretože En kation znižuje elektroosmotický tok. Pre denatóniový kation bola maximálna účinnosť výrazne nižšia, keď bol použitý enfosfátový elektrolyt [10].

Bitrex bol stanovený v denaturovaných alkoholových formuláciách s použitím trietylbenzylamónium chloridu ako vnútorného štandardu. Boli testované tri komerčne dostupné vzorky: denaturovaný etanol, čistič skla a kvapalina do ostrekovačov metódou kalibračnej krivky. Bola vypočítaná výťažnosť pre vzorky, pohybovala sa medzi 93 a 104 % čo naznačovalo, že interferencie ostatných zložiek matrice neboli významné a podmienky kapilárnej elektroforézy boli vhodné na získanie odpovedajúcej presnosti metódy. Ku výhodám

tejto metódy patrí minimálna doba nastavenia, nižšia závislosť na matici vzorky, nižšie náklady a spotreba činidiel v kratšej dobe analýzy poskytuje lepšiu účinnosť separácie [10].

2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

2.1 Použité chemikálie

octan draselný (Sigma-Aldrich)

kyselina octová (98%) (Penta)

denatónium benzoát (dodávateľ: Sigma-Aldrich)

benzethoniumchlorid (Sigma-Aldrich)

β -alanín (Sigma-Aldrich)

L-leucín (Sigma-Aldrich)

2.2 Prístroje a zariadenie

Elektroforetický analyzátor EA 102, VillaLabeco, Slovensko

Elektrický varič integrovaný s magnetickým miešadlom, SA, Kanada

Analytické váhy KERN ABT 120 – 4M, Gottle, KERN & Sohn GmbH., Nemecko

Laboratórny pH meter GRYF 208 L, GRYF HB, spol. s.r.o., Česká republika

Sklenená kombinovaná pH elektroda Fisherbrand FB68788, USA

Pipety Biohit o rôznych objemoch

Elektroforetický analyzátor EA 102

Je to dvojkolónový prístroj, ktorý sa používa na analytickú a mikropreparatívnu izotachofórezu aniónov a kationov. Obsahuje dve teflónové kolóny – predseparačnú a analytickú na ktorých prebieha separácia. Horná kolóna má dĺžku 90 mm a je vybavená vodivostným detektorom. Vzorky sa dávkujú dávkovacím kohútom s objemom 30 μ l. Prístroj je ovládaný počítačom v programe ITPPro, ktorý umožňuje naprogramovať priebeh analýzy, zaznamenáva signál z detektorov a umožňuje vyhodnotenie.

2.3 Pracovné podmienky

Analýza sa robila v kationovom režime a trvala približne 45 minút. Prúd v predseparačnej kolóne bol nastavený na 500 μ A a pred detekciou bol znížený na 300 μ A, v analytickej kolóne bol prúd 60 μ A a pred detekciou bol znížený na 30 μ A. Záznamy použité na vyhodnotenie dát boli získané z vodivostného detektoru z analytickej kolóny.

2.4 Príprava roztokov

Na prípravu roztokov bola použitá demineralizovaná voda z laboratórneho rozvodu a bežné laboratórne odmerné pomôcky. Na získanie menších objemov roztokov boli použité mikropipety značky Biohit o rôznych objemoch.

príprava $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l zásobného roztoku denatónium benzoátu

Bolo navážených 0,0223 g denatónium benzoátu, obsah bol prevedený do 50 ml odmernej banky a doplnený demineralizovanou vodou po rysku.

príprava 500 μ g/ml zásobného roztoku denatónium benzoátu

Bolo navážených 0,025 g denatónium benzoátu, obsah bol prevedený do 50 ml odmernej banky a doplnený demineralizovanou vodou po rysku.

príprava 0,01 mol/l zásobného roztoku benzethonium chloridu

Do 50 ml odmernej banky bolo navážených 0,224 g benzethonium chloridu a banka bola doplnená demineralizovanou vodou po rysku.

príprava $1 \cdot 10^{-4}$ roztoku denatónium benzoátu

Do kadičky bol napipetovaný 1 ml zásobného roztoku denatónium benzoátu a zriedený 9 ml vody.

príprava $2 \cdot 10^{-4}$ roztoku denatónium benzoátu

Do kadičky boli napipetované 2 ml zásobného roztoku denatónium benzoátu, pridalo sa 7,8 ml vody a 200 μ l 0,01 M roztoku benzethonium chloridu.

príprava $2,5 \cdot 10^{-4}$ M roztoku denatónium benzoátu

Do kadičky bolo napipetovaných 2,5 ml zásobného roztoku DB, pridalo sa 7,5 ml vody a 100 μ l benzethonium chloridu.

2.5 Elektrolyty pre ITP analýzu

Vedúci elektrolyt L: 0,01 M octan draselný a kyselina octová (pH 5,5 – 4)

Bolo navážených 0,0989 g octanu draselného, obsah bol kvantitatívne prevedený do 100 ml odmernej banky a doplnila sa destilovanou vodou po rysku. Tento roztok bol prevedený do kadičky s miešadlom a za stáleho miešania bola po malých objemoch pridávaná 1 M kyselina octová tak, aby sa dosiahlo pH 5,5. Takto boli postupne pripravované pufre o pH 5; 4,5 a 4, ktoré boli použité na optimalizáciu pH vedúceho elektrolytu.

Koncový elektrolyt T: 0,01 M kyselina octová

Do 50 ml odmernej banky bol napipetovaný 0,5 ml 1 M kyseliny octovej a bol doplnený destilovanou vodou po rysku.

2.6 Príprava kalibračných roztokov denatónium benzoátu

Z 500 μ g/ml roztoku denatónium benzoátu boli pripravené kalibračné roztoky o koncentráciách 25, 50, 75 a 100 mg/l odpipetovaním 2,5; 5; 7,5 a 10 ml do 50 ml odmerných

baniek. Do každej banky sa pridalo 100 µl 0,01 mol/l roztoku benzethonium chloridu a doplnilo destilovanou vodou po rysku.

Zo zásobného roztoku denatónium benzoátu o koncentrácii $1 \cdot 10^{-3}$ boli pripravené kalibračné roztoky o koncentráciách 2, 5, 10, 200 a $400 \cdot 10^{-6}$ odpipetovaním 100 µl; 250 µl; 0,5; 10 a 20 ml do 50 ml odmerných baniek, pridalo sa 50 µl benzethonium chloridu a doplnilo destilovanou vodou po rysku.

2.7 Stanovenie denatónium benzoátu v modelových roztokoch

Modelové zmesi boli najskôr použité na identifikáciu zóny denatónium benzoátu. Pomocou modelových zmesí boli tiež optimalizované niektoré prístrojové parametre ako časovanie jednotlivých krokov a nastavenie napätia jednotlivých krokov.

2.8 Príprava denatónium benzoátu na analýzu

Do kadičky bolo odmeraných 50 ml etanolu, boli pridané 2 ml roztoku denatónium benzoátu o koncentrácii 500 µg/ml (tj. celkom 25 mg DB) a bolo vhodené magnetické miešadlo. Roztok bol zohrievaný a odparovaný do sucha. Po odparení sa pridalo 10 ml vody, 20 µl 0,01 mol/l roztoku benzethonium chloridu a takto pripravený roztok sa dávkovoval do prístroja a analyzoval.

2.9 Reálne vzorky

Vzorka č. 1 je technický lieh denaturovaný určený do liehových varičov, na horenie a na svietenie a okrem iného sa používa aj na čistenie, odmasťovanie a dezinfekciu.

Vzorka č. 1 – technický lieh denaturovaný

výrobca: ŠK SPEKTRUM, s.r.o.

krajina pôvodu: Slovensko

obsah DB: 10 mg/l

deklarované zloženie: etanol min. 90 obj. %



Obrázok 5: vzorka č. 1

2.10 Príprava reálnej vzorky na analýzu

Zo vzorky č. 1 bolo do kadičky odmeraných 50 ml, bolo vložené magnetické miešadlo a vzorka bola na variči odparovaná do sucha. Po odparení bolo pridaných 10 ml destilovanej vody, 20 μ l 0,01 M roztoku benzethonium chloridu a takto pripravená vzorka bola analyzovaná. Do druhej kadičky bolo odmeraných 50 ml vzorky č. 1, bol pridaný 1 ml zásobného roztoku denatónium benzoátu o koncentrácii $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l (štandardný prídavok) a obsah v kadičke bol odparovaný do sucha. Po odparení bolo pridaných 10 ml destilovanej vody, 20 μ l 0,01 mol/l roztoku benzethonium chloridu a takto pripravená vzorka bola analyzovaná.

3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

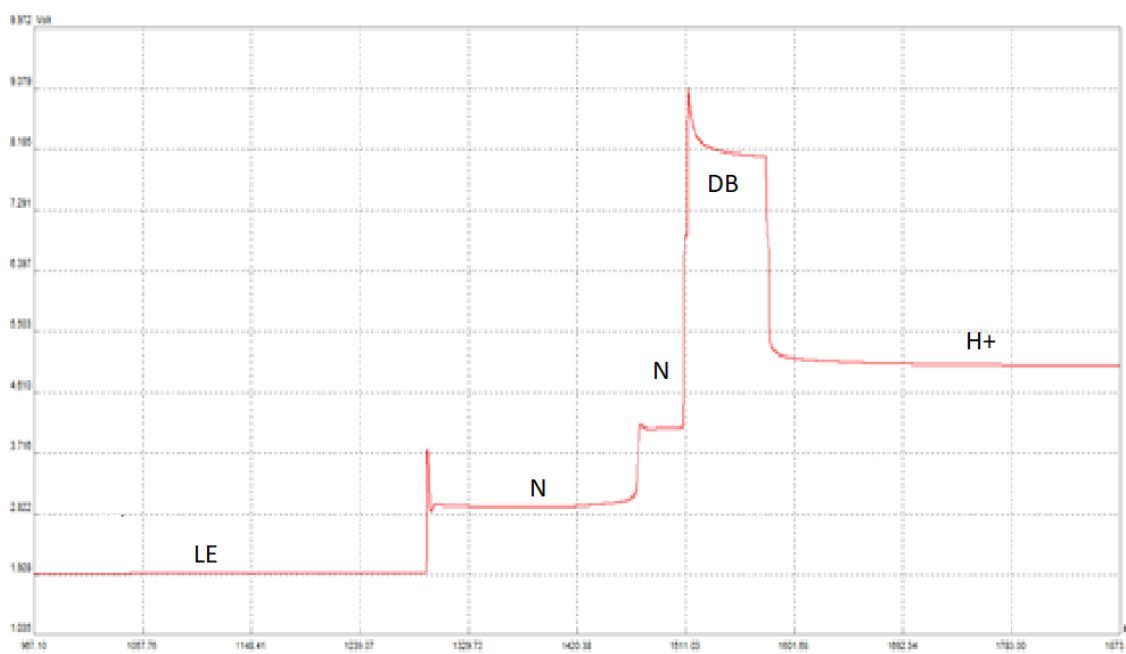
Pomocou izotachoforézy je možné analyzovať látky elektricky nabité – tj. tvoriace katióny a anióny, ktoré majú dostatočnú pohyblivosť v elektrickom poli a to v roztokoch o nepříliš vysokom či nízkom pH.

Denatónium benzoát je slabou bázou, ktorej disociačná konstanta pK_a je 4,05 [2]. Môžeme predpokladať, že protonizovaná forma denatónium benzoátu je kationom s nízkou pohyblivosťou. Tento kation by mohlo možno stanoviť pomocou vynútenej ITP.

3.1 Úvodné pokusy

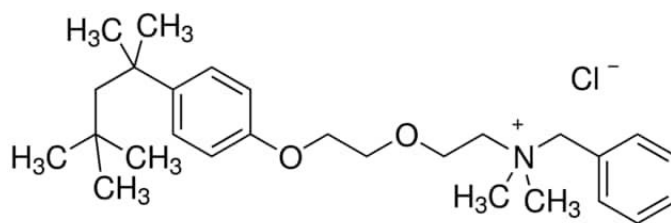
Ako vedúci elektrolyt bol zvolený roztok octanu draselného, ktorého pH bolo nastavené kyselinou octovou, vedúcim iónom bol teda K^+ . Koncovým elektrolytom bola kyselina octová a koncovým iónom bol H^+ .

Pri meraní modelového roztoku bolo zistené, že denatónium benzoát tvorí zónu (obrázok 6), na zlepšenie parametrov tejto zóny bol skúšaný prídavok ďalšej látky, ktorá by za podmienok analýzy tvorila kation o ešte menšej mobilite než denatónium benzoát.

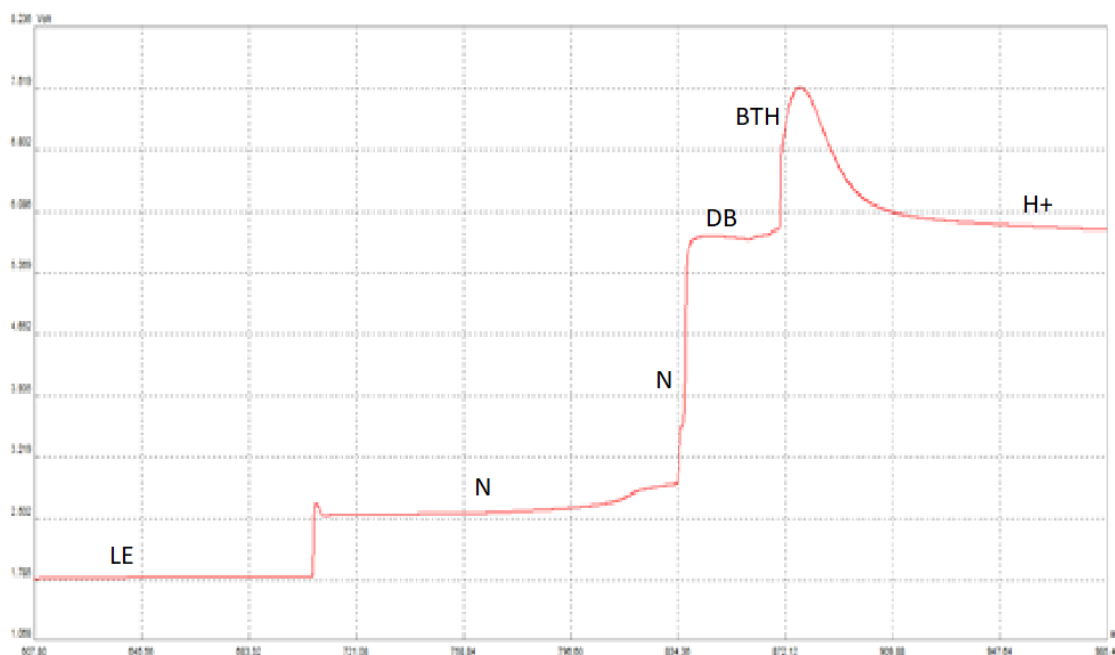


Obrázok 6 : izotachoforegram modelového roztoku denatónium benzoátu, dolná kolóna (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, H⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)

Do roztoku denatónium benzoátu bol postupne pridávaný β -alanín, L-leucín a benzethonium chlorid, z ktorých najlepšie rozlíšil zónu denatónium benzoátu (obrázok 8) benzethonium chlorid (obrázok 7), ktorý bol ďalej používaný na analýzy.



Obrázok 7: štruktúra benzethonium chloridu [38]



Obrázok 8: izotachoforegram modelového roztoku DB s prídavkom BTH, dolná kolóna (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)

3.2 Optimalizácia krokov analýzy

Boli analyzované roztoky denatónium benzoátu s prídavkami benzethonium chloridu o rôznych koncentráciách na optimalizáciu krokov napätia a času jednotlivých krokov analýzy, ako aj najlepšie rozdelenie zóny denatónium benzoátu.

3.3 Optimalizácia pH vedúceho elektrolytu

Ako ďalší optimalizačný krok bola vyskúšaná zmena pH vedúceho elektrolytu. Denatónium benzoát bol analyzovaný pri pH vedúceho elektrolytu 4; 4,5; 5; 5,5 a 6; pričom pH bolo nastavované malými prídavkami 1 M kyseliny octovej do roztoku vedúceho elektrolytu. Pri použití pH 5 a vyššom bol vedúci elektrolyt málo kyslý a tým mal aj príliš malú vodivosť

a dochádzalo ku prekročeniu maximálneho separačného napätia a ku predčasnému ukončeniu analýzy. Pri použití pH 4 bol vedúci elektrolyt príliš kyslý, takže nedošlo ku rozdeleniu látok v zmesi kvôli vysokej pohyblivosti koncového iónu. Pri ďalších meraniach bol ako vedúci elektrolyt použitý 0,01 M octan draselný s pH 4,5.

Pri analýze modelových vzoriek bolo zisťované, či sa denatónium benzoát dobre separuje od ostatných látok, kde sa vyskytuje zóna denatónium benzoát a či je dĺžka jeho signálu stabilná aj po premeraní modelovej vzorky ďalší deň.

Na vymedzenie výskytu denatónium benzoátu na grafe bola ako prvá premeraná vzorka neobsahujúca denatónium benzoát. Potom bol premeraná modelová vzorka obsahujúca denatónium benzoát, grafy boli porovnané a bola identifikovaná zóna denatónium benzoátu.

Tiež bola zisťovaná reprodukovateľnosť merania modelovej vzorky obsahujúcej denatónium benzoát.

Nakoncentrovanie denatónium benzoátu vo vzorke denaturovaného liehu a zmena matrice z organickej (ktorá by sa musela riediť na max. cca 15% organickej zložky kvôli prístroju) na vodnú.

3.4 Reprodukovateľnosť

Reprodukovateľnosť merania bola vyjadrená ako relatívna smerodajná odchýlka (RSD) dĺžok zón. Na určenie reprodukovateľnosti sa urobili dve sady meraní modelovej vzorky denatónium benzoátu o dvoch rôznych koncentráciách. Z nameraných hodnôt bola vypočítaná smerodajná odchýlka a relatívna smerodajná odchýlka. Ako modelová vzorka boli pripravené roztoky denatónium benzoátu o koncentráciách $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l (tabuľka 3) a $1,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l (tabuľka 4) s prídavkom 100 μ l 0,01 mol/l roztoku benzethonium chloridu. V tabuľkách sú uvedené dĺžky zón denatónium benzoátu na jednotlivé merania, smerodajná odchýlka a relatívna smerodajná odchýlka.

Tabuľka 3: Výsledky opakovaného merania roztoku o konc. $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l

meranie	dĺžka zóny (s)
1	34,75
2	34,9
3	34,9

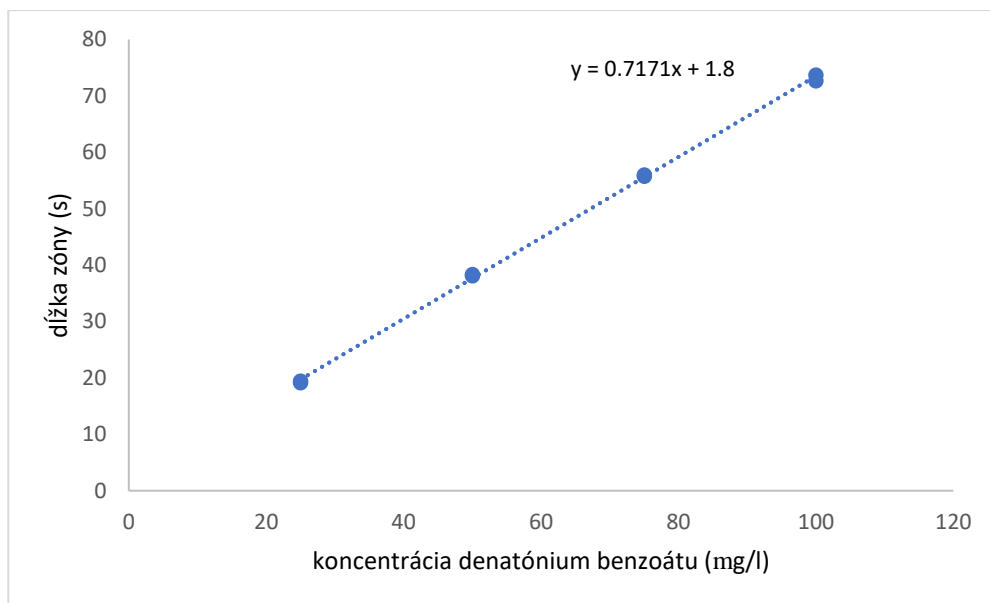
4	34,35
5	33,7
6	34,45
7	33,65
8	33,9
9	33,8
10	34,2
priemer	34,26
SD	0,46
RSD (%)	1,35

Tabuľka 4: Výsledky opakovaného merania roztoku o konc. $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$

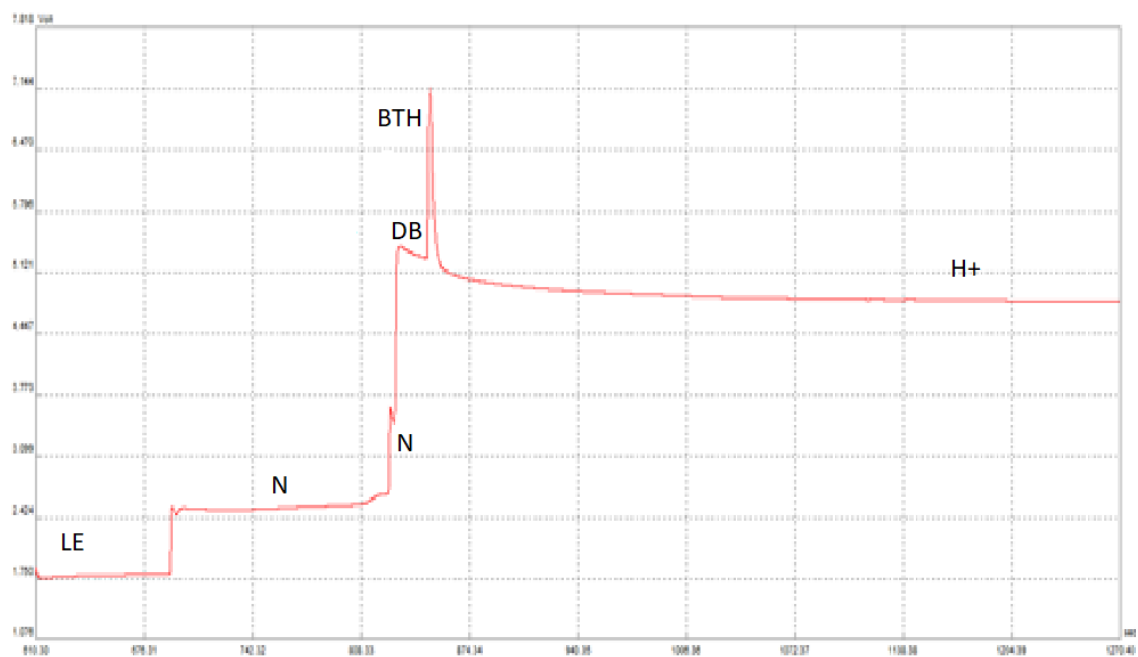
meranie	dĺžka zóny (s)
1	53,1
2	52,75
3	53,45
4	53,1
5	52,45
priemer	52,97
SD	0,34
RSD (%)	0,64

Kalibračná závislosť

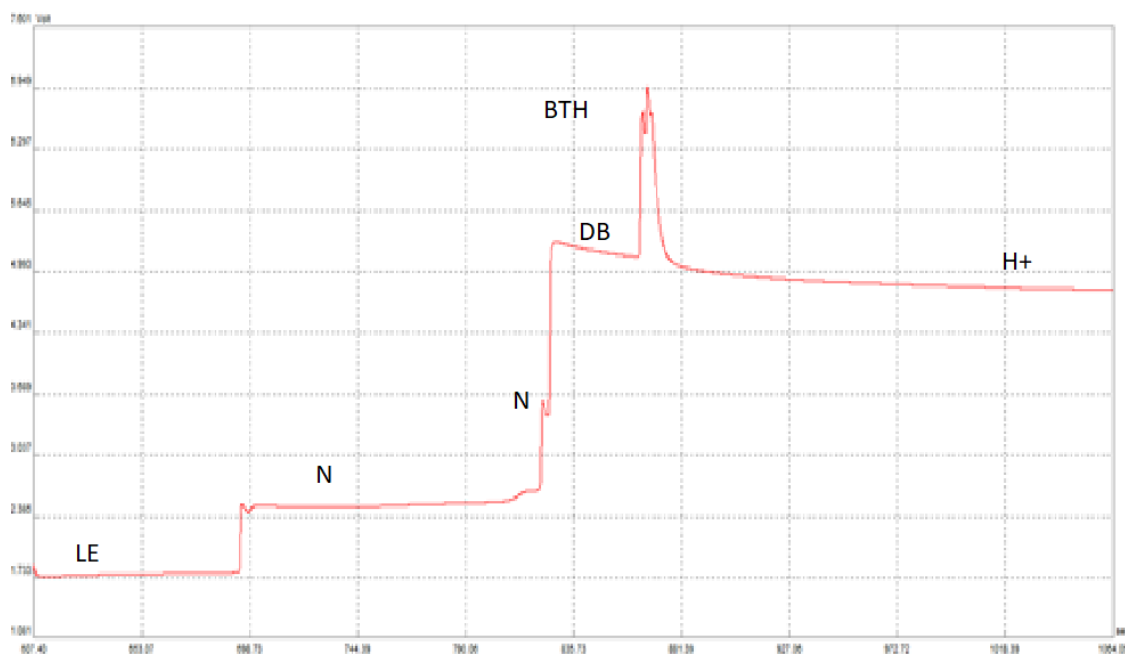
Premeriavanie roztokov denatónium benzoátu o rôznych koncentráciách bola zisťovaná linearita kalibračnej priamky, čiže závislosť odozvy signálu na koncentracii. Z pripraveného zásobného roztoku denatónium benzoátu o koncentracii 500 mg/l boli namiešané roztoky o koncentráciách 25, 50, 75 a 100 mg/l do 50 ml odmerných baniek do ktorých bolo pridaných 100 μl 0,01 mol/l roztoku benzethonium chloridu. Z nameraných hodnôt bol vytvorený graf 1 závislosti dĺžky zóny denatónium benzoátu v závislosti na koncentracii denatónium benzoátu (obrázok 9-12).



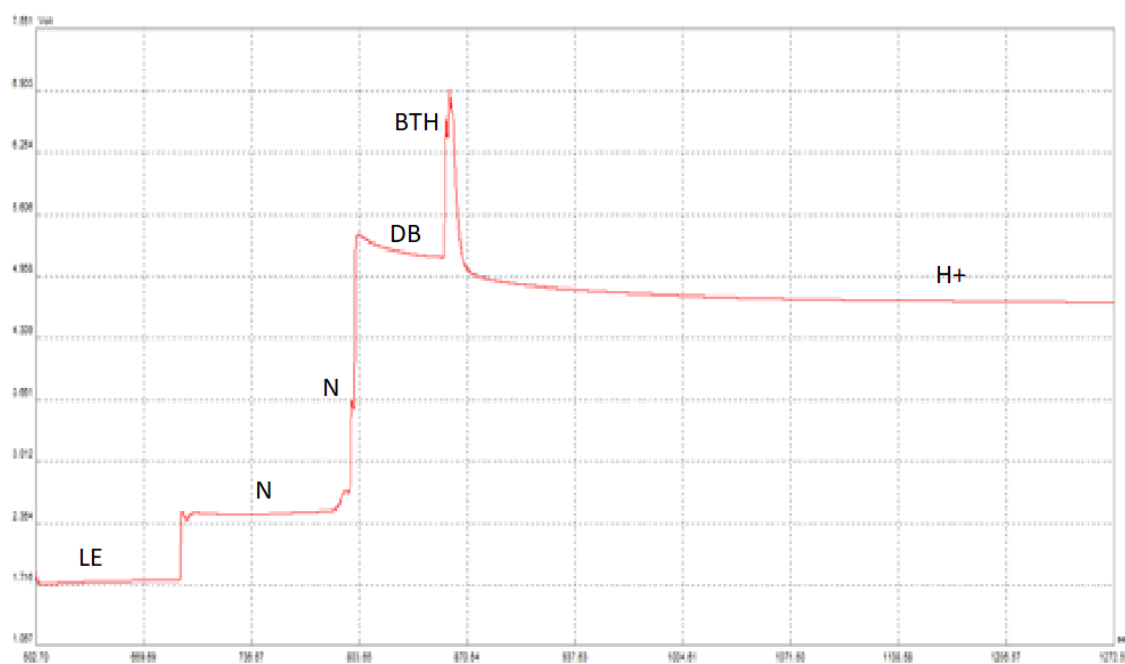
Graf 1: Kalibračná závislosť dĺžky zóny denatónium benzoátu na koncentrácii denatónium benzoátu vo vzorke denaturovaného liehu



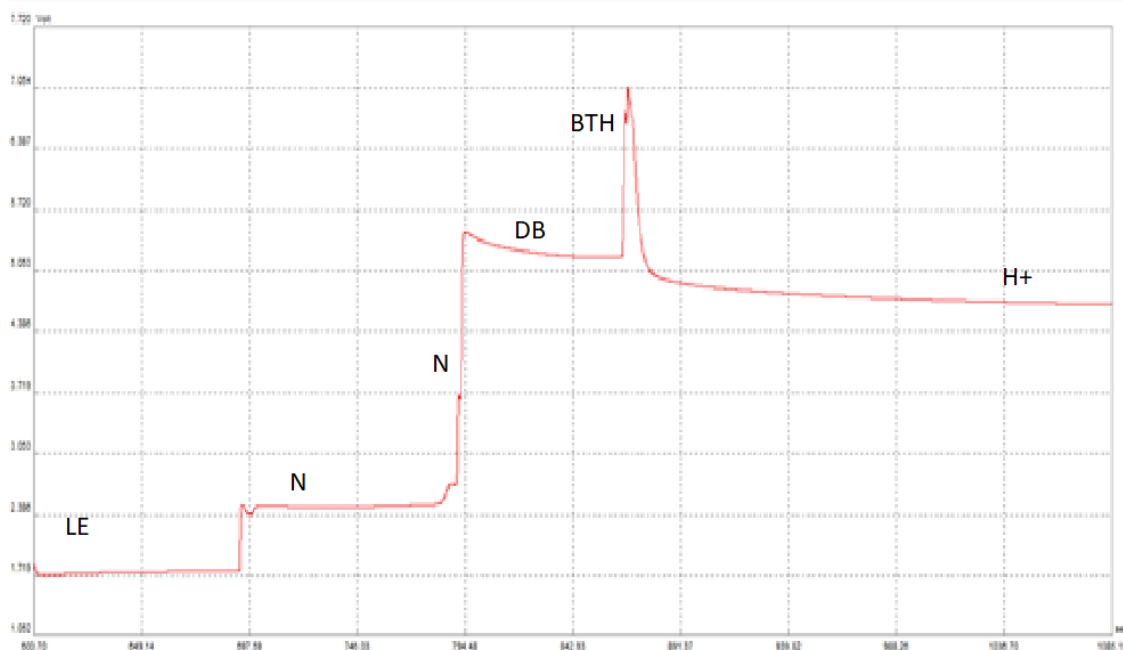
Obrázok 9: izotachforegram modelovej vzorky denatónium benzoátu o koncentrácii 25 mg/l (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)



Obrázok 10: izotachoforegram modelovej vzorky denatónium benzoátu o koncentrácii 50 mg/l (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)



Obrázok 11: izotachoforegram modelovej vzorky denatónium benzoátu o koncentrácii 75 mg/l (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)



Obrázok 12: izotachoforegram modelovej vzorky denatónium benzoátu o koncentrácii 100 mg/l (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H⁺ - koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)

Štandardný prídavok

Koncentráciu denatónium benzoátu vo vzorke denaturovaného liehu sme stanovovali aj metódou štandardného prídavku (tabuľka 5) premeraním dvoch roztokov o koncentrácii 0 a 50 mg/l a z ktorých bol potom vytvorený graf závislosti dĺžky zóny denatónium benzoátu v závislosti na koncentrácii denatónium benzoátu.

Tabuľka 5: Hodnoty metódy štandardného prídavku u vzorky denaturovaného liehu

stanovenie	koncentrácia (mg/l)	dĺžka zóny (s)	kalibračná rovnica (y=s, x=ml)
štandardný prídavok	0	37,87	y = 0,7156x + 37,87
	50	73,65	

Vždy po príprave nového vedúceho elektrolytu bola vždy premeraná nová kalibrácia (tabuľka 6-7).

Tabuľka 6: Hodnoty metódy kalibračnej krivky u vzorky denaturovaného liehu

stanovenie	koncentrácia (mg/l)	dĺžka zóny (s)	kalibračná rovnica (y=s, x=mg/l)
kalibračná krivka	4,4658	5,2	$y = 0,7655x + 1,0744$
	4,4658	4,6	
	89,316	70,2	
	89,316	67,1	
	178,632	137,45	
	178,632	138,95	

Tabuľka 7: Hodnoty metódy kalibračnej krivky u vzorky denaturovaného liehu

stanovenie	koncentrácia (mg/l)	dĺžka zóny (s)	kalibračná rovnica (y=s, x=mg/l)
kalibračná krivka	44,658	33,6	$y = 0,6972x + 3,2$
	44,658	34	
	89,316	66,5	
	89,316	66,05	
	178,632	127,35	
	178,632	127,6	

3.5 Výťažnosť metódy (analýza modelovej vzorky)

Na overenie správnosti metódy boli urobené analýzy denatónium benzoátu v modelovej vzorke. Na overenie bola použitá metóda kalibračnej krivky a metóda štandardného prídavku. Koncentrácia denatónium benzoátu bola zvolená na 50 mg/l. Modelová vzorka bola premeraná dvakrát. Ďalej bola premeraná modelová vzorka s prídavkom 50 mg/l. Správnosť alebo výťažnosť metódy je vyjadrená ako podiel nájdenej priemernej koncentrácie denatónium benzoátu a koncentrácie skutočnej, vyjadrené v percentách.

Tabuľka 8: *Správnosť metódy*

koncentrácia modelovej vzorky (mg/l)	50,0
nájdená koncentrácia (mg/l) – kalibračná krivka	50,3
výtťažnosť (%) – kalibračná krivka	100,6
Nájdená koncentrácia (mg/l) – štandardný prídavok	52,9
výtťažnosť (%) – štandardný prídavok	105,8

V tabuľke 8 sú uvedené výtťažnosti pre metódu kalibračnej krivky a štandardného prídavku. Obidve metódy poskytovali výtťažnosť blízku 100 %. Metóda kalibračnej krivky poskytla správnejšie výsledky ako metóda štandardného prídavku.

Detekčný limit a medz stanovenia

Ako detekčný limit bola stanovená najnižšia koncentrácia, ktorá ešte poskytuje identifikovateľnú zónu v izotachoforegrame. Pre túto analýzu to bola zóna o dĺžke 0,95 sekúnd. Medz stanoviteľnosti je tu daná ako trojnásobok detekčného limitu. Detekčný limit a medz stanovenia sú uvedené v tabuľke 9. Obe hodnoty sú uvedené pre dávkované vodné roztoky. Pre reálne vzorky budú tieto hodnoty iné podľa toho, či bude možné DB zo vzorky nakoncentrovať alebo naopak bude nutné vzhľadom ku matici vzorku riediť.

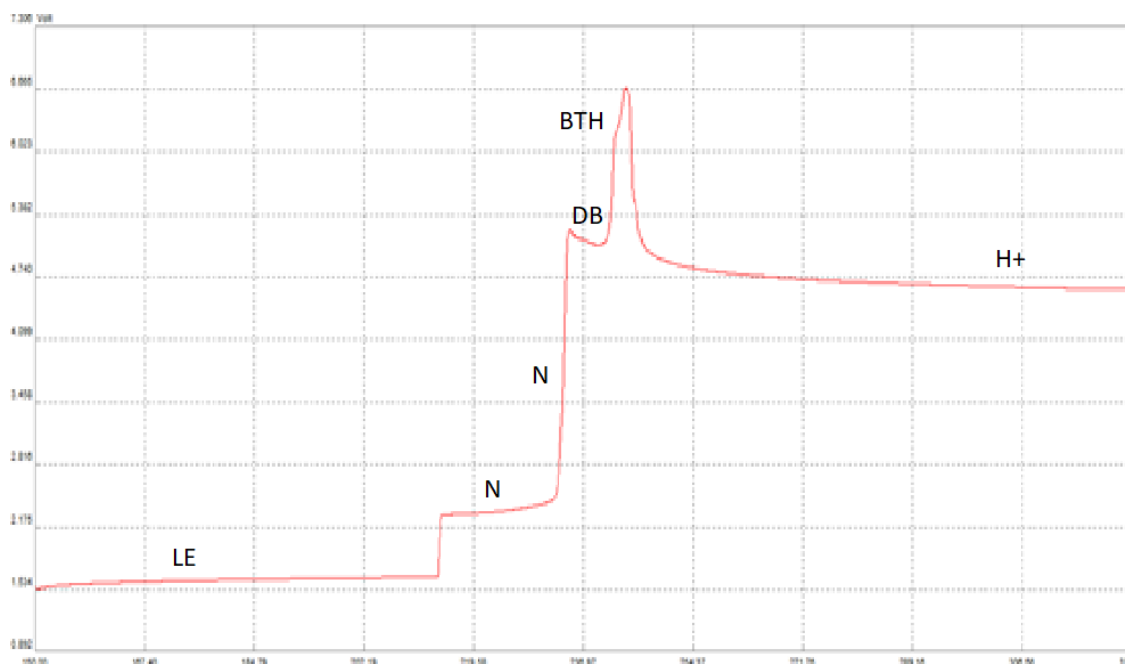
Tabuľka 9: *Detekčný limit a medz stanovenia*

	Koncentrácia DB (mg/l)
detekčný limit	0,9
Medz stanovenia	3

3.6 Analýza reálnych vzoriek

Vypracovaný postup bol odskúšaný na analýzu reálnej vzorky. Na tieto merania bola ako vzorka použitá denaturovaný lieh technický obsahujúci denatónium benzoát. Vzorka bola upravená podľa vyššie uvedeného postupu, čiže po odparení do sucha bol pridaný známy objem vody a benzethonium chloridu, a analyzovaný s použitým elektrolytovým systémom (obrázok 13). Koncentrácia denatónium benzoátu bola stanovovaná metódou štandardného prídavku (tabuľka 10 a 12) a metódou kalibračnej krivky (tabuľka 13). Na stanovenie denatónium benzoátu u denaturovaného technického liehu pomocou kalibračnej krivky bola každá vzorka premeraná štyrikrát. Na zistenie koncentrácie štandardným prídavkom bol použitý jeden

prídavok – 1 ml zásobného roztoku denatónium benzoátu o koncentrácii $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l (= 446,58 mg/l). Vzorka s prídavkom zásobného roztoku denatónium benzoátu bola premeraná tiež štyrikrát. Prídavky boli pridané ku vzorke pred odparením (tabuľka 11 a 14).



Obrázok 13: izotachoforegram vzorky denaturovaného liehu, dolná kolóna (LE – vedúci elektrolyt 0,01M octan draselný, N – neznáma zóna, DB – denatónium benzoát, BTH – benzethonium chlorid, H⁺ – koncový elektrolyt 0,01M kyselina octová)

Tabuľka 10: Hodnoty metódy štandardného prídavku vo vzorke denaturovaného liehu

stanovenie	objem pridaného DB (ml 1mM DB do 50 ml)	dĺžka zóny (s)	kalibračná rovnica (y=s, x=ml)
štandardný prídavok	0	54.975	$y = 32.913x + 54.975$
	1	87.8875	

Tabuľka 11: Zistený obsah denatónium benzoátu vo vzorke denaturovaného liehu

stanovenie	Zistená koncentrácia denatónium benzoátu	deklarovaná koncentrácia denatónium benzoátu
kalibračná krivka	13,35 mg/l	10 mg/l
štandardný prídavok	13,0 mg/l	

Tabuľka 12: Hodnoty metódy štandardného prídavku vo vzorke denaturovaného liehu

stanovenie	objem pridaného DB (ml 1mM DB do 50 ml)	dĺžka zóny (s)	kalibračná rovnica (y=s, x=ml)
štandardný prídavok	0	49.9625	y = 32.913x + 54.975
	1	83.4375	

Tabuľka 13: Hodnoty metódy kalibračnej krivky vo vzorke denaturovaného liehu

stanovenie	koncentrácia (mg/l)	dĺžka zóny (s)	kalibračná rovnica (y=s, x=mg/l)
kalibračná krivka	44.658	33.6	y = 0.6972x + 3.2
	44.658	34	
	89.316	66.5	
	89.316	66.05	
	178.632	127.35	
	178.632	127.6	

Tabuľka 14: Zistený obsah denatónium benzoátu vo vzorke denaturovaného liehu

stanovenie	zistená koncentrácia denatónium benzoátu	deklarovaná koncentrácia denatónium benzoátu
kalibračná krivka	13,4 mg/l	10 mg/l
štandardný prídavok	13,3 mg/l	

4 ZÁVER

Táto práca sa zaoberala stanovením denatónium benzoátu pomocou izotachoforézy v kationovom režime v technickom liehu denaturovanom. Izotachoforéza patrí medzi elektromigračné separačné metódy, umožňuje analyzovať zmesi elektricky nabitých látok v roztokoch.

V teoretickej časti práce sa zaoberáme denaturáciou alkoholu, ako môže byť denaturovaný ako aj stručný prehľad rôznych denaturačných činidiel, medzi ktoré patrí aj denatónium benzoát, čo je témou diplomovej práce.

Najskôr boli stručne popísané jeho vlastnosti a štruktúra ako vyzerá, kedy bol objavený, jeho biochémia, toxické účinky ak nejaké sú ako aj jeho široké použitie.

V ďalšej časti diplomovej práce sme tiež uviedli prehľad metód na stanovenie tohoto denaturačného činidla.

V experimentálnej časti sme najskôr museli optimalizovať izotachoforetické stanovenie denatónium benzoátu v kationovom režime a potom následné stanovenie koncentrácie denatónium benzoátu v jednej reálnej vzorkách, ktorou bol technický lieh denaturovaný. Na separáciu sa použil elektrolytový systém s vedúcim elektrolytom tvoreným 0,01 M octanom draselným, po prídavku kyseliny octovej mal pH 4,5. Ako koncový elektrolyt sa použila 0,01 M kyselina octová.

Správnosť metódy bola zistená pomocou výťažnosti stanovenia denatónium benzoátu v modelovej vzorke metódou kalibračnej krivky a metódou štandardného prídavku. Obidve metódy poskytovali výťažnosť blízku 100%. Ďalej bol určený detekčný limit, ktorý bol 0,9 mg/l a mez stanovenia, ktorá vyšla 3 mg/l.

Z optimalizácie výsledkov je táto metóda vhodná na analýzu denatónium benzoátu v technickom denaturovanom liehu. Na kvantitatívnu analýzu boli použité dve metódy a to metóda kalibračnej krivky a metóda štandardného prídavku. Výsledky u oboch metód sa trochu líšili. Metódou kalibračnej krivky bol obsah denatónium benzoátu vo vzorke liehu 13,4 mg/l a 13,35 mg. Oproti tomu metódou štandardného prídavku vyšlo 13,3 mg/l a 13,0 mg/l.

5 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] Final Report of the Safety Assessment of Alcohol Denat., Including SD Alcohol 3-A, SD Alcohol 30, SD Alcohol 39, SD Alcohol 39-B, SD Alcohol 39-C, SD Alcohol 40, SD Alcohol 40-B, and SD Alcohol 40-C, and the Denaturants, Quassin, Brucine Sulfate/Brucine, and Denatonium Benzoate¹. *International Journal of Toxicology*. 2008, 27(1), 1-43. ISSN 1091-5818. Dostupné z: doi:10.1080/10915810802032388
- [2] VAN BOXTEL, Niels, Kris WOLFS, Marta GUILLÉN PALACÍN, Ann VAN SCHEPDAEL a Erwin ADAMS. Comprehensive headspace gas chromatographic analysis of denaturants in denatured ethanol. *Journal of Separation Science*. 2017, 40(20), 4004-4011. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201700468
- [3] *NARIADENIE KOMISIE (EHS) č. 100/72 zo 14. januára 1972 o stanovení podrobných pravidiel pre denaturovanie cukru určeného pre krmivo zvierat: Úradný vestník Európskej únie* [online]. [cit. 2022-05-04].
- [4] PERRON, Brian, Joseph HARONEY, David HAYES, Rebeccah SOKOL a Seth KOLTON. Potentially serious consequences for the use of Bitrex as a deterrent for the intentional inhalation of computer duster sprays. *Forensic Toxicology*. 2021, 39(1), 286-290. ISSN 1860-8965. Dostupné z: doi:10.1007/s11419-020-00559-2
- [5] Final Report Study of Aversive Agents. *Consumer Product Safety Commission United States of America*. 2011.
- [6] KRUSE, James A. Methanol and Ethylene Glycol Intoxication. *Critical Care Clinics*. 2012, 28(4), 661-711. ISSN 07490704. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccc.2012.07.002
- [7] *Evropské nařízení pro úplnou (obecnou) denaturaci lihu* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2018 [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: <https://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/lih-a-alkoholicke-napojje/nove-evropske-narizeni-pro-uplnou.html>
- [8] OLMOS, J.M. a C.M. PEREIRA. Electrochemical sensing and characterization of denatonium ion by ion transfer at polarized liquid/liquid interfaces. *Journal of*

- Electroanalytical Chemistry*. 2020, 859. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2020.113860
- [9] OLMOS, J.M. a C.M. PEREIRA. Electrochemical sensing and characterization of denatonium ion by ion transfer at polarized liquid/liquid interfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2020, 859, 1-5. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2020.113860
- [10] PRANAITYT?, B., Z. DAUNORAVICIUS a A. PADARAUSKAS. Development and Validation of a Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Denatonium Benzoate in Denaturated Alcohol Formulations. *Chromatographia*. 2004, 60(5-6). ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-004-0376-8
- [11] YOUAKIM, Sami. Adverse Reactions Associated With Respirator Fit Testing of Healthcare Workers in British Columbia, Canada: A Review of Compensation Claim Cases. *Archives of Environmental & Occupational Health*. 2010, 62(4), 197-200. ISSN 1933-8244. Dostupné z: doi:10.3200/AEOH.62.4.197-200
- [12] LEGE, Sascha, Gaëlle GUILLET, Sylvain MEREL, Jorge Eduardo YANEZ HERAS a Christian ZWIENER. Denatonium – A so far unrecognized but ubiquitous water contaminant?. *Water Research*. 2017, 112, 254-260. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2017.01.056
- [13] KAUKAINEN, Dale E. a Alan P. BUCKLE. Evaluation of aversive agents to increase the selectivity of rodenticides with emphasis on denatonium benzoate (Bitrex) bittering agent. *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference*. 1992, (15), 192-198. ISSN 0507-6773.
- [14] SIBERT, J R a N FRUDE. Bittering agents in the prevention of accidental poisoning: children's reactions to denatonium benzoate (Bitrex). *Emergency Medicine Journal*. 1991, 8(1), 1-7. ISSN 1472-0205. Dostupné z: doi:10.1136/emj.8.1.1
- [15] LEGE, Sascha, Anna EISENHOFER, Jorge Eduardo Yanez HERAS a Christian ZWIENER. Identification of transformation products of denatonium – Occurrence in wastewater treatment plants and surface waters. *Science of The Total Environment*. 2019, 686, 140-150. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.05.423

- [16] WHITE, Nicole C., Toby LITOVITZ, Blaine E. BENSON, B. Zane HOROWITZ, Lisa MARR-LYON a Marisa K. WHITE. The Impact of Bittering Agents on Pediatric Ingestions of Antifreeze. *Clinical Pediatrics*. 2009, 48(9), 913-921. ISSN 0009-9228. Dostupné z: doi:10.1177/0009922809339522
- [17] BERNING, C, J GRIFFITH a J WILD. Research on the effectiveness of denatonium benzoate as a deterrent to liquid detergent ingestion by children. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1982, 2(1), 44-48. ISSN 02720590. Dostupné z: doi:10.1016/S0272-0590(82)80063-8
- [18] CHEN, Kou-Huang, Kuo-Mou CHUNG, Ju-Hui CHUNG a Kow-Tong CHEN. Asthma associated with denatonium benzoate in a healthcare worker in Taiwan. *Medicine*. 2019, 98(21). ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/MD.00000000000015818
- [19] Denatonium benzoate. In: *Sigmaaldrich* [online]. [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/SK/en/product/aldrich/d5765>
- [20] *Preparation of a quaternary ammonium hydroxide and use thereof for the preparation of q quaternary ammonium salt* [online]. [cit. 2022-01-31]. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/EP1824814A2/en>
- [21] Preparation of a quaternary ammonium hydroxide and use thereof for the preparation of q quaternary ammonium salt. In: *Google patents* [online]. [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/EP1824814A2/en>
- [22] LIU, Sisi, Shibao CHEN, Xiaohao LI et al. Development and application of diffusive gradients in thin-films for in situ sampling of the bitterest chemical – denatonium benzoate in waters. *Journal of Hazardous Materials*. 2021, 418. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126393
- [23] NG, Lay-Keow, Michel HUPÉ, Jean HARNOIS a André H. LAWRENCE. Direct Injection Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Analysis for Denatonium Benzoate in Specific Denatured Alcohol Formulations. *Analytical Chemistry*. 1998, 70(20), 4389-4393. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac980093r
- [24] VAN BOXTEL, Niels, Kris WOLFS, Marta Guillén PALACÍN, Ann VAN SCHEPDAEL a Erwin ADAMS. Headspace gas chromatography based methodology for

- the analysis of aromatic substituted quaternary ammonium salts. *Journal of Chromatography A*. 2016, 1476, 105-113. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.11.009
- [25] VAN BOXTEL, Niels, Kris WOLFS, Marta GUILLÉN PALACÍN, Ann VAN SCHEPDAEL a Erwin ADAMS. Comprehensive headspace gas chromatographic analysis of denaturants in denatured ethanol. *Journal of Separation Science*. 2017, 40(20), 4004-4011. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201700468
- [26] BĄCHOR, Remigiusz, Alicja KLUCZYK, Piotr STEFANOWICZ a Zbigniew SZEWCZUK. Facile synthesis of deuterium-labeled denatonium cation and its application in the quantitative analysis of Bitrex by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, 407(21), 6557-6561. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8815-y
- [27] HENDERSON, M.C., C.M. NEUMANN a D.R. BUHLER. Analysis of denatonium benzoate in oregon consumer products by HPLC. *Chemosphere*. 1998, 36(1), 203-210. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(97)10033-9
- [28] FAULKNER, Arthur a Pierre DEMONTIGNY. High-performance liquid chromatographic determination of denatonium benzoate in ethanol with 5% polyvinylpyrrolidone. *Journal of Chromatography A*. 1995, 715(1), 189-194. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(95)00542-U
- [29] GADZAŁA-KOPCIUCH, R. M., T. BUSZEWSKA a B. BUSZEWSKI. ISOLATION AND DETERMINATION OF DENATONIUM BENZOATE IN ANTIFREEZING AGENTS BY SOLID PHASE EXTRACTION AND HPLC. 2011, 23(20), 3133-3142. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1081/JLC-100102373
- [30] DAUNORAVIČIUS, Ž., I. JUKNAITĖ, E. NAUJALIS a A. PADARAUSKAS. Simple and Rapid Determination of Denaturants in Alcohol Formulations by Hydrophilic Interaction Chromatography. *Chromatographia*. 2006, 63(7-8), 373-377. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-006-0768-z

- [31] 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(6), 321-324.
- [32] GLOVER, M. J. a A. J. BLAKE. Separation and thin-layer chromatographic determination of denatonium benzoate and other quaternary ammonium denaturants in spirituous preparations. *The Analyst*. 1972, 97(1160). ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/an9729700891
- [33] BUCCI, Remo, Fabrizio BALESTRIERI, Andrea D. MAGRÌ, Antonio L. MAGRÌ a Federico MARINI. UV-vis spectrophotometric method for the quantitation of all the components of Italian general denaturant and its application to check the conformity of alcohol samples. *Talanta*. 2006, 68(3), 781-790. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2005.06.002
- [34] NAMBIAR, O. G. B., Kalpana GOSAVI a T. RAVINDRANATHAN. Plastic membrane ion-selective electrode for the determination of denatonium benzoate (Bitrex). *The Analyst*. 1991, 116(10). ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/an9911601011
- [35] KWIATKOWSKI, Andrzej, Małgorzata CZERWICKA, Janusz SMULKO a Piotr STEPNOWSKI. Detection of Denatonium Benzoate (Bitrex) Remnants in Noncommercial Alcoholic Beverages by Raman Spectroscopy. *Journal of Forensic Sciences*. 2014, 59(5), 1358-1363. ISSN 00221198. Dostupné z: doi:10.1111/1556-4029.12461
- [36] GEBAUER, P. a P. BOČEK. Zone order in isotachopheresis. *Journal of Chromatography A*. 1983, 267, 49-65. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)90818-0
- [37] MIKKERS, F.E.P., F.M. EVERAERTS a J.A.F. PEEK. Isotachopheresis: The concepts of resolution, load capacity separation efficiency II. Experimental evaluation. *Journal of Chromatography A*. 1979, 168(2), 317-332. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(79)80002-3
- [38] Benzethonium Chloride. In: *Central drug house* [online]. [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.cdhfinechemical.com/benzethonium-chloride-meets-usp-41-nf-36-ep-90-jp>

- [39] NEURATH, HANS, JESSE GREENSTEIN, FRANK PUTNAM a JOHN ERICKSON. THE CHEMISTRY OF PROTEIN DENATURATION. *Chemical Reviews*. 1944, 34(2), 157-265.
- [40] Whey Proteins and Their Thermal Denaturation - A Review. *Irish Journal of Food Science and Technology*. 1987, 11(1), 43-75.
- [41] XIONG, Youling L. Protein Denaturation and Functionality Losses. *Quality in Frozen Foods*. Boston, MA: Springer US, 1997, 111-140. ISBN 978-0-412-07041-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4615-5975-7_8
- [42] ADAM, Martin. *Konzervárenství [pdf]*. 1.3.2010: 15 s., 2022.
- [43] PŘÍHODA, Josef, Marie HRUŠKOVÁ a Pavel SKŘIVAN. *Cereální chemie a technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0530-7.
- [44] DE GRAAF, Leontine A. Denaturation of proteins from a non-food perspective. *Journal of Biotechnology*. 2000, 79(3), 299-306. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1656(00)00245-5
- [45] TANFORD, Charles. Protein Denaturation. *Advances in Protein Chemistry Volume 24*. Elsevier, 1970, 1-95. Advances in Protein Chemistry. ISBN 9780120342242. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-3233(08)60241-7
- [46] MALI, Bhagwat, Dayasagar RATHOD a Manchak GARAD. Thin-layer chromatographic determination of diazepam, phenobarbitone, and saccharin in toddy samples. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*. 2005, 18(104), 330-332. ISSN 0933-4173. Dostupné z: doi:10.1556/JPC.18.2005.4.16