

## 鹽基性色素 Methylene Blue에 의한 Oleic Acid의 吸光光度定量

李 淑 淵

淑明女子大學校 藥學大學

### A Study on Spectrophotometric Determination of Oleic Acid by Basic Dye Methylene Blue.

Sook Yun Lee\*

(Received, Jun 18, 1974)

A new spectrophotometric method was established for the determination of oleic acid. This method is based on the 1,2-dichloroethane extraction of the ion-pair formed between methylene blue and oleic acid. But the absorbance of an ion-pair in the 1,2-dichloroethane layer was variable with the temperature, the ion-pair was extracted back into a diluted hydrochloric acid solution. The maximum absorbance of the acid extract observed at  $660m\mu$  and a linear relationship was observed from the initial amount over the range of 50-800 $\gamma$ /ml of oleic acid in the aqueous phase. The composition ratio of the ion-pair formed between methylene blue and oleic acid was determined to be 2:1 by both the mole ratio and continuous variation methods.

### 緒 論

鹽基性 色素에 依하여 金屬性 陰 ion을 溶媒 抽出 吸光光度定量한 例는 rhodamine B에 依한 鹽酸水溶液中的  $Hg^{++}$ 을 benzene, dioxans 混合溶媒로서 抽出<sup>1)</sup> U(vl)를  $HNO_3$

\*College of Pharmacy, Suk Meun University

水溶液中에서 rhodamine G 를 使用하여 benzene, acetone 混合溶媒로써 抽出<sup>2)</sup>, triphenyl methane 系色素에 依한 rhenium 溶媒 抽出 吸光光度定量<sup>3)</sup>, alkylbenzene sulfonic acid 를 cation 性色素인 methylene blue와 錯體를 형성시켜 有機溶媒로써 추출한 方法<sup>4)</sup> 등이 있다.

著者は cation 性色素에 依한 高級脂肪酸의 溶媒 抽出 吸光光度定量法の 確立 可能性을 檢討하여 보았다. 우선 動植物의 油脂中 보통 glycerine ester로써 存在하는 脂肪酸 oleic acid를 檢討하였다.

Oleic acid는 olive油, 茶實油中에는 약 80%, 豚脂, 牛脂中 약 50%가 ester로써 存在하고 있으며 軟膏, 軟비누, 研摩劑, 防水劑, 潤滑油 등의 製劑原料로 變용되고 있다.

從前의 分析法으로는 定性的 인 分離 目的으로 paper chromatography<sup>5)</sup>, column chromatography<sup>6)</sup> 및 誘導體로 하여 melting point 測定등의 確認法이 있으며, 定量的으로는 U. V.-method<sup>8)</sup> 및 iode 價, 酸價測定法이 있다. 最近에는 gas chromatography에 依한 定量法<sup>9)</sup>도 있으나, 他物質들과 混合되었을 時 선택적인 比色的 特徵이 있으므로 應用途가 넓고 비교적 간단한 시설로 定量할 수 있다.

Oleic acid를 1,2-dichloroethane에 녹여 basic dye인 methylene blue 수용액과 反應시켜 有機層에 定量的으로 抽出한 다음 安定性を 고려하여 다시 堊산산성 수용액에서 역추출하여 660 mu에서 吸光도를 測定 比色分析을 하였다.

이 結果 oleic acid의 濃도가 50 $\gamma$ -800 $\gamma$ /ml에서 Lambert-Bear 法則이 成立하였으므로 이에 보고하고자 한다.

## 實 驗 方 法

1. 試藥—Oleic acid 2g을 精秤하여 1,2-dichloroethane에 溶解시켜 1l로 하여 標準液으로 하였으며 必要時 회색시켜 使用하였다.

Methylene blue solution( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  및  $\text{NaHCO}_3$  含有)은 methylene blue 374mg을 精秤하여  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  용액( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  90g/l) 1l에 溶解한 후 이액 40 ml에  $\text{NaHCO}_3$  2 ml을 混和하여 使用하였다. HCl 溶液은 0.5M—HCl 2 ml을 증류수 40 ml에 混和하여 使用하였다.

2. 裝置—Spectrophotometer; Beckmann DU type과 Hitachi spectrophotometer (double beam, auto recoder EPS-3T) 진탕기; 진폭 5.5 cm, 240 strokes/min

3. 標準 操作—50 ml 원심관에 1,2-dichloroethane 9ml, oleic acid 標準 溶液 1ml,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  및  $\text{NaHCO}_3$ 를 含有한 methylene blue solution 10 ml을 加하고 진탕기에서 3分間 진탕한 후 separating funnel을 使用하여 有機溶媒層을 分離 후 이 溶媒層을 원심분리하여 다시 水層과 分離한 후 이 1,2-dichloro ethane층중 5ml을 取하여 공전원심관에 넣고 HCl solution 10ml을 加하여 진탕기에서 3分間 진탕하여 逆抽出한다. Separating funnel을 使用하여 分離後 遠心分離하여 極大吸收 波長인 660mu에서 吸光도를 測定한다.

### 實驗 結果 및 考察

抽出 溶媒의 影響—抽出 溶媒로써 1,2-dichloroethane, chloroform, benzene, ethyl ether, toluene, nitrobenzene, carbon tetrachloride, n-butyl alcohol, ethyl acetate 등에 對하여 검토한 結果 Table I. 에서 보는 바와 같이 1,2-dichloroethane 및 chloroform 이 비교적 양호하였다.

원심관에 1,2-dichloroethane 및 chloroform 각각 9 ml씩 加하고 1,2-dichloroethane 및 chloroform에 溶解한 oleic acid 標準液을 희석하여 1 ml(400ppm)을 加한 후  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  및  $\text{NaHCO}_3$ 를 含有한 methylene blue solution을 각각 10ml씩 加하여 3分間 진탕기에서 抽出하여 吸光度를 測定한 結果 極大吸收波長이 각각 655mu, 652mu이었다. 그러나 chloroform를 抽出溶媒로 使用하면 1,2-dichloroethane에 比하여 reagent blank값이 크므로 同一 濃度에서 1,2-dichloroethane을 사용 時보다 吸光度가 감소하였으며, 또한 chloroform중에 안정제로 存在하는 alcohol이 ion對를 形成하지 않는 methylene blue가 지 chloroform층에 이행시켜 blank의 吸光度에 큰 影響을 주므로<sup>10)</sup> 適合치 못했다. 따라서 本 實驗에서는 1,2-dichloroethane을 最適 溶媒로 選擇하였다.

#### 有機 溶媒 抽出 時의 檢討

吸收 Spectrum—50ml 遠心管에 1,2-dichloroethane 9 ml을 取하고 oleic acid 표준용액 (400ppm) 1ml을 加한 다음  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  및  $\text{NaHCO}_3$ 를 含有한 methylene blue solution 10 ml을 加한 후 진탕기에서 3분간 진탕 후 有機溶媒層을 分取하여 원심분리 후 吸光度를 測定한 結果 Fig. 1에서 보는 바와 같이 655mu에서 最大 吸收를 나타내었다.

$\text{NaHCO}_3$  濃度の 影響— $\text{NaHCO}_3$ 의 濃度を 각각 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2M 등으로 變化시켜 만든  $\text{NaHCO}_3$  溶液 2 ml을 各各 取하고  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  含有한 methylene blue solution ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 90g/L) 40 ml을 各各 加하여  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  및  $\text{NaHCO}_3$ 를 含有한 methylene blue solution을 만들어 이 液 各 10 ml에 oleic acid 標準溶液(400ppm/ml) 1ml, 1,2-dichloroethane 9 ml을 加하고 진탕기에서 3分間 진탕 후 有機溶媒層을 分取하여 吸光度를 測定한 結果 Fig. 2에서와 같이 0.1M- $\text{NaHCO}_3$ (total concentration;  $4.8 \times 10^{-3}\text{M}$ )일 경우 가장 좋은 結果를 나타내었다.

$\text{Na}_2\text{SO}_4$  濃度の 影響— $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 含有한 methylene blue solution 調製 時  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 의 濃度を 각각 6, 7, 8, 9, 10% 水溶液으로 만들고 이 液 40 ml에 0.1M- $\text{NaHCO}_3$  2 ml를 加하여  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  및  $\text{NaHCO}_3$ 를 含有한 methylene blue solution을 만들어 이 液 各 10ml에 oleic acid 標準溶液 1ml(400ppm) 및 1,2-dichloroethane 9ml을 加한 후 진탕기에서 3分間 진탕 후 유기층을 分取하여 원심분리 후 655mu에서 吸光度를 測定한 結果  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 의 濃도가 9%일 때 가장 좋은 結果를 나타내었다. (Fig. 3).

振盪 時間의 影響—Oleic acid solution 1ml(400ppm)을 取하여 標準 操作에 따라 1,2-dichloroethane으로 抽出時 抽出時間과 吸光度와의 關係를 檢討한 結果 Fig. 4. 에서와 같이 2분이 상에서는 一定하였으므로 本 實驗에서는 3分間 振盪하였다.

溫度變化의 影響—Oleic acid solution(400ppm) 1ml을 取하여 標準操作에 따라 1,2-dichloroethane으로 methylene blue와 oleic acid의 ion對를 抽出時 溫度를 10~25°C로 變化시켜 抽出하고 遠心分離한 다음 有機層이 吸光度를 測定한 結果 Fig. 5. 에서와 같이 溫度가 增加할수록 吸光度도 增加한다. 同一 操作을 한 blank의 色도 溫度가 增加함에 따라 blue에서 violet<sup>1)</sup>으로 變化하여 吸光度도 增加한다. 따라서 本實驗을 行할 때는 一定 溫度에서 抽出하는 것이 좋다.

吸光度의 經時 變化—Oleic acid solution(400ppm) 1ml을 取하여 標準操作에 따라 操作時 1,2-dichloroethane에 抽出된 oleic acid와 methylene blue의 ion對의 時間 經過에 따른 吸光度의 變化를 檢討한 結果 Fig. 6. 에서와 같이 5분까지는 多少 減少하는 감이 있으나 6分 以後는 감소율이 커져 비교적 不安定한 狀態임을 나타내었다.

#### 鹽酸溶液으로 逆抽出時的 檢討

吸收 Spectrum—Oleic acid 標準溶液(800ppm) 1ml을 取하여 標準 操作에 依하여 定量한 結果 Fig. 7. 에서 보는 바와 같이 660mu에서 吸收 極大를 나타내었다.

鹽酸 濃度の 影響—Oleic acid 표준용액(800ppm)에 對하여 HCl의 濃度を 各各 0.025, 0.05, 0.075, 0.1M 등으로 變化시켜 조제 후 이들 液 2ml씩에 蒸留水 40ml씩 加하여 各種 濃度の HCl solution을 調製하여 鹽酸濃度の 影響을 標準操作에 依하여 實驗한 結果 Fig. 8. 에서와 같이 0.05M HCl (total concentration;  $2.4 \times 10^{-3}M$ )일 때가 가장 좋은 結果를 나타내었다.

振盪 時間의 影響—Oleic acid 표준용액(800ppm) 1ml을 取하여 標準 定量 操作에 따라 얻은 1,2-dichloroethane층을 다시 HCl solution으로 逆抽出 時振盪 時間과 吸光度의 關係는 Fig. 9. 에서 보는 바와 같이 2分 以上에서는 一定하였다. 따라서 本實驗에서는 3分間 振盪하였다.

溫度 變化의 影響—Oleic acid 표준용액(800ppm) 1ml을 取하여 표준정량 조작에 따라 얻은 1,2-dichloroethane층중 5 ml을 分取하여 HCl solution 10ml로 逆抽出 時 HCl solution의 溫度를 變化시켜 吸光度를 測定한 結果 Fig. 10. 에서와 같이 HCl solution의 溫度가 증가되어도 15~25°C에서는 一定함을 알 수 있다.

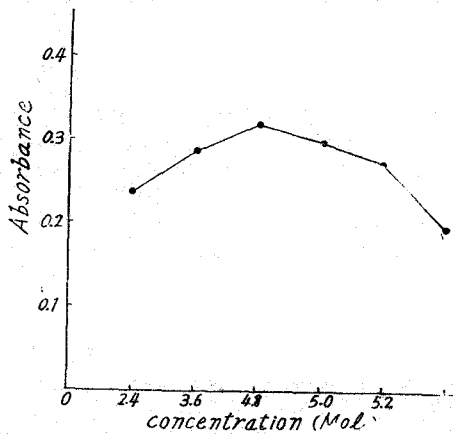
吸光光度의 經時 變化—Oleic acid 표준용액(800ppm) 1ml을 取하여 標準定量操作에 따라 얻어진 水層의 同一 溫度에 있어서의 色의 經時變化를 檢討한 結果 Fig. 11. 에서와 같이 거의 變化가 없었다.

**Calibration curve**—Oleic acid 표준용액 200, 400, 600, 800, 1,000 ppm 1ml 씩을 取하여 標準 定量 操作에 따라서 얻어진 水層을 reagent blank를 對照液으로 極大 吸收波

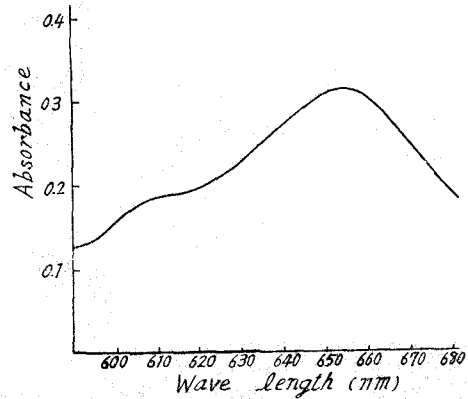
長인 660mu에서 吸光度를 測定한 結果 Fig. 12. 에서와 같이 直線을 이루었다.

**Mole ratio method**—Oleic acid의 濃度를  $3 \times 10^{-3}M$ 로 固定하고  $Na_2SO_4$  및  $NaHCO_3$ 를 含有한 methylene blue solution의 濃度를  $0.5 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1.5 \times 10^{-4}$ ,  $2.0 \times 10^{-4}$ ,  $2.5 \times 10^{-4}$ ,  $3.0 \times 10^{-4}M$ 로 變化시켜 표준정량 조작에 따라 吸光度를 測定한 結果 Fig. 13에 서와 같이 oleic acid와 methylene blue의 比는 2 : 1임을 알았다.

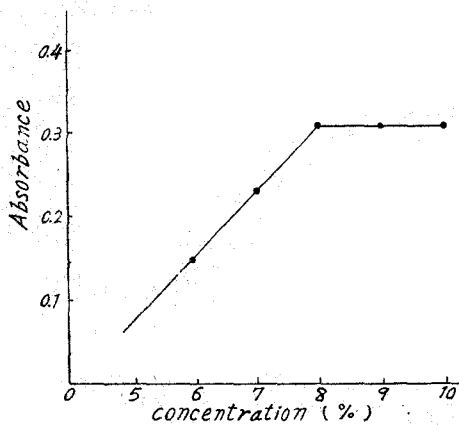
**Continuous variation method**— $Na_2SO_4$  및  $NaHCO_3$ 를 含有한 methylene blue solution의 濃度를  $4 \times 10^{-4}M \sim 0.5 \times 10^{-4}M$ 로 調製하고 oleic acid의 濃度를  $0.5 \times 10^{-3} \sim 4.0 \times 10^{-3}M$ 로 調製하여 1ml을 取하여 표준정량 조작에 따라 두 成分의 比를 變化시키면서 吸光度를 測定한 結果 Fig. 14. 에서와 같이 oleic acid와 methylene blue의 比는 2 : 1의 조성비를 갖



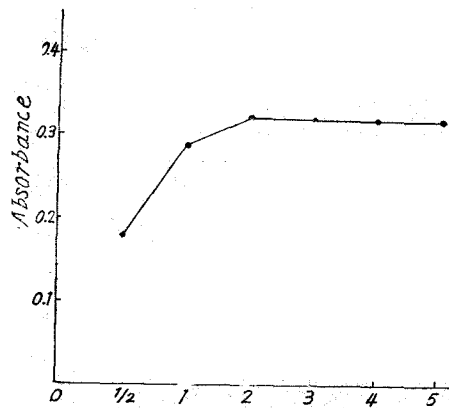
**Fig. 1.** Absorption curve of oleic acid methylene blue complex. (18°C). Total concentration of oleic acid; 40ppm.



**Fig. 2.** Effect of  $NaHCO_3$  concentration (17°C). Total concentration of oleic acid; 40ppm.



**Fig. 3.** Effect of  $Na_2SO_4$  concentration (17°C). Total concentration of oleic acid; 40ppm.



**Fig. 4.** Effect of shaking time (18.5°C). Total concentration of oleic acid; 40ppm.

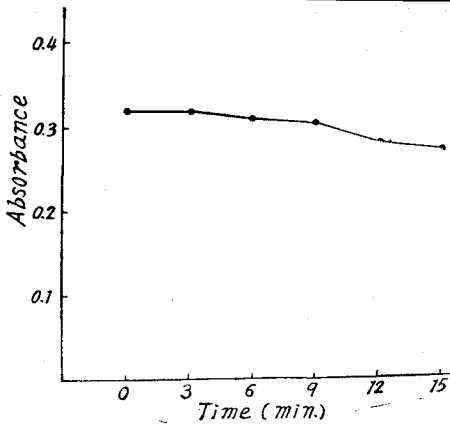


Fig. 5. Effect of temperature total concentration of oleic acid, Total concentration of oleic acid; 40ppm.

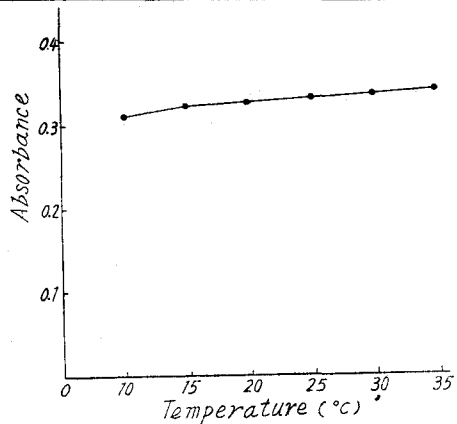


Fig. 6. Stability of colored solution in 1,2-dichloroethane (17°C). Total concentration of oleic acid; 40ppm.

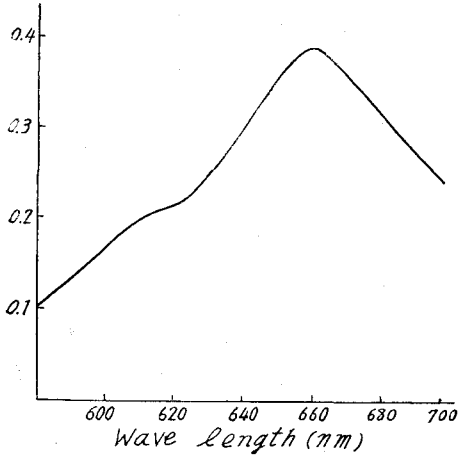


Fig. 7. Absorption curve of methylene blue oleic acid complex. (18°C). Total concentration of oleic acid; 40ppm.

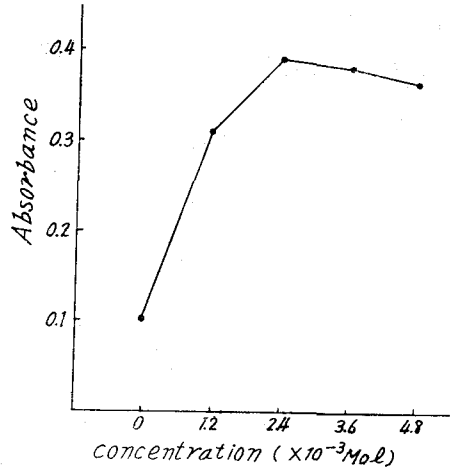


Fig. 8. Effect of HCl concentration (17°C). Total concentration of oleic acid; 40ppm.

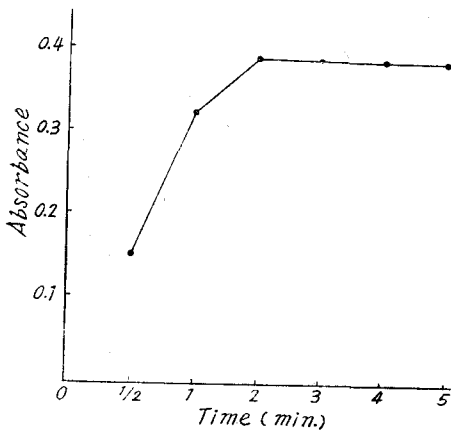


Fig. 9. Effect of shaking time (18°C). Total Concentration of oleic acid; 40ppm.

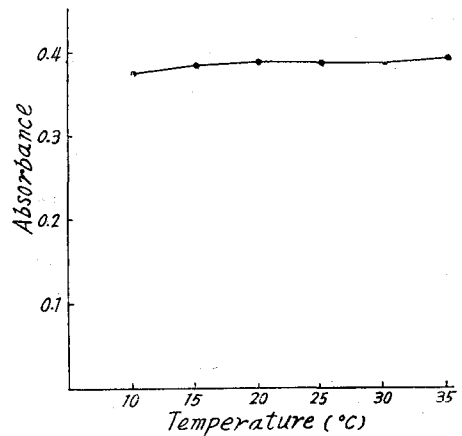


Fig. 10. Effect of temperature of colored solution in HCl solution. (18°C). Total concentration of oleic acid; 40ppm

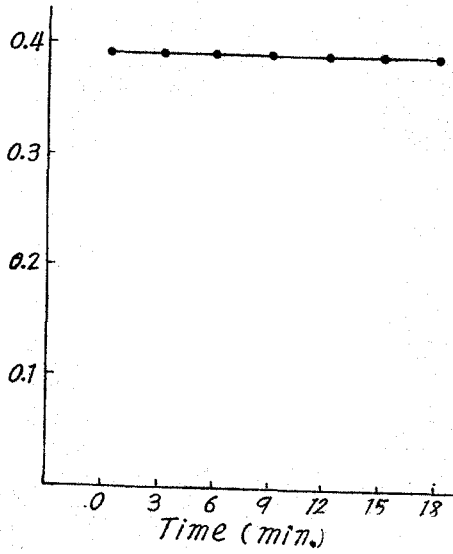


Fig. 11. Stability of colored solution in HCl solution (18°C). Total concentration of oleic acid; 40ppm.

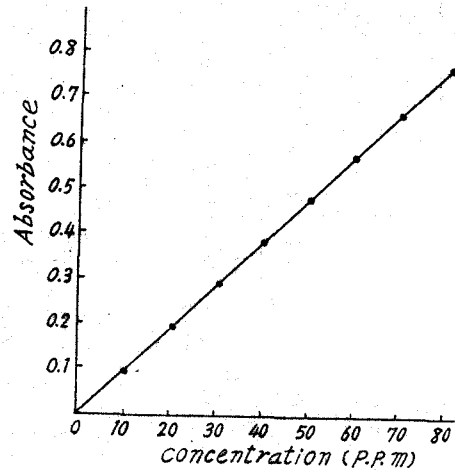


Fig. 12. Calibration curve (15.5°C).

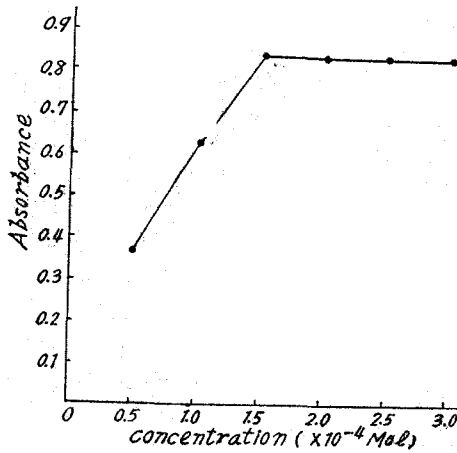


Fig. 13. Molar ratio of oleic acid and methylene blue (Mole ratio method).

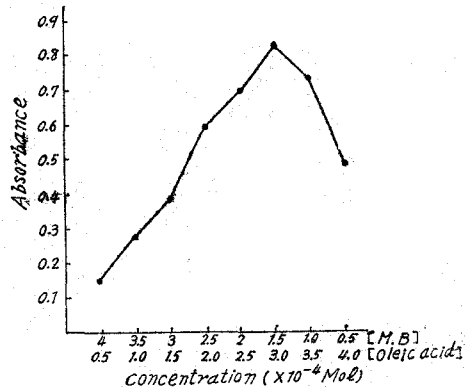


Fig. 14. Molar ratio of oleic acid and methylene blue (Continuous variation method).

**Table I.** Extract ability of solvents

Solvents	Extract ability	Assorbance
1,2-dichloroethane	+	0.320
chloroform	+	0.28
benzene	-	-
ethyl ether	-	-
toluene	-	-
nitrobenzene	○	-
carbon tetrachloride	-	-
ethyl acetate	-	-
N-butyl alcohol	○	-

+ : quantitatively extracted

○ : methylene blue solution itself extracted

- : not extracted

**Table II.** Standard deviation

No	Oleic acid found	Deviation	%
1	380.1	1.99	95.0
2	395.4	4.6	98.9
3	379.8	2.02	95.0
4	403.7	3.7	100.9
5	398.6	1.4	99.7

Theoretical amount : 400 $\gamma$ /ml  
Standard deviation : 3.6%

는 것을 알았다.

### Reproducibility

Oleic acid를 標準定量 操作에 따라 定量한 結果 Table II에서와 같이 標準偏差 3.6% 以內에서 定量 可能하였다.

### 結 論

Basic dye인 methylene blue와 抽出 溶媒 1,2-dichloroethane을 使用하여 溶媒 抽出法에 依한 oleic acid의 定量法을 確立하였다. 이 結果를 利用하여 모든 다른 高級脂肪酸도 定量될 것으로 推定된다.

Oleic acid 定量 時 溫度의 影響이 가장 크므로 一定한 溫度를 維持하여야 하며 同時に 同一 條件으로 檢量線을 作成함이 좋다.

抽出 溶媒는 1,2-dichloroethane이 가장 좋았으며 有機溶媒層은 blank의 色이 溫度에 의 해 變하며 經時 變化가 甚하였으나, HCl solution으로 逆抽出 時는 별 變化가 없었다.



## 文 獻

1. 今井弘：日本化學雜誌 **90**, 275(1969)
2. N.R. Burtnek, *et al.* : *Zh. Analit. Khim*, **23**. 700. (1968)
3. 大久保保二, 小島益生：分析化學 **14**. 843 (1965)
4. APHA, AWWA, WPCE : "Standard method for Examination of water and waste, 11th., p.246 (1960)
5. Inoue, 油脂化學 協會誌, **1**, 136 (1952)
6. M.M. Graff. *et al.* : *Ind. Eng. chem, Anal Ed.*, **15**. 340 (1943)
7. H.P. Kaufmann, *et al.* : *Fette U. Seifen*, **50**, 519 (1943)
8. 日本化學會編, 「實驗化學 講座」1卷(上) p.224 丸善(1957)
9. E. von Rudloff: *Canad. J. Chem* **39**, 1190 (1961)
10. 懸田祐介, 神原富民, 分析化學, **14**. 641 (1965)
11. 內海喩, 伊藤舜介, 分析化學, **16** 1213 (1967)