**Лабораторні роботи № 5 та 6**

**ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИЙ РОЗДІЛ І НАПІВКІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ХАРЧОВИХ СИНТЕТИЧНИХ БАРВНИКІВ Е 122 і Е 124, Е 102 і Е 133 У ЇХ СУМІШАХ**

**Мета роботи.** Приготування агарового гелю із концентрацією 1%. Оцінка вмісту барвників Е 122 та Е 124, Е 102 та Е 133 у їх бікомпонентних сумішах напівкількісним методом.

**Реактиви та обладнання:** харчові синтетичні барвники Е 102, Е 122, Е 124 та Е 133, агар-агар (х.ч.), дигідрофосфат калію (х.ч.), гідрофосфат натрію (х.ч.), гліцерин (х .ч.), етиловий спирт (об'ємна частка 96%); мірний циліндр місткістю 200 мл, термостійкий хімічний стакан місткістю 250 мл, скляна паличка, мірні колби місткістю 1000, 10 мл, піпетки з поділками місткістю 1, 5 мл, пеніцилінки місткістю 15 мл, микрошприц на 100 мкл, фільтрувальний папір, лінійка; ваги аналітичні, водяна баня, камера для горизонтального електрофорезу «SE-2» та джерело живлення «Ельф-4», столик для заливки гелю, рамка гелієва і гребінки.

**Хід роботи.**

1. *Приготування буферного фосфатного розчину з рН 6.0.*

Наважки солей KH2PO4 та Na2HPO4 масою 0.35315 г та 5.79240 г відповідно перенести кількісно в мірну колбу місткістю 1000 мл і довести до мітки дистильованою водою*.*

1. *Приготування агарового гелю із концентрацією 1%.*

Для приготування 1% агарового гелю навішування агар-агару масою 1.5 г помістити в термостійку хімічну склянку місткістю 250 мл і розчинити в 150 мл буферного фосфатного розчину з рН 6.0 при перемішуванні. Отриманий розчин поставити на водяну лазню та періодично помішуючи скляною паличкою, нагрівати 35 хв, не допускаючи кипіння.

Розчин охолодити за кімнатної температури до 55-60 °С. При цьому не допускається утворення поверхневої плівки, піни, розшарування. Отриманий гель має бути прозорим та не містити окремих нерозплавлених частинок.

Вирівняти столик для заливання, залити розплавлений гель у гелієву рамку, не допускаючи утворення бульбашок повітря. Встановити гребінки, не торкаючись дна форми, з відривом щонайменше 3 см одна від одної.

Після повного застигання гелю (зазвичай 30 хв при кімнатній температурі 18 - 25 ° С) витягти гребінки обережно, плавним рухом вгору, намагаючись не пошкодити лунки, що утворилися.

1. *Приготування вихідних розчинів барвників Е 102, Е 122, Е 124 та Е 133.* Вихідні розчини готували ваговим методом з наважок з подальшим розведенням фосфатним буферним розчином з рН 6.0.

Концентрація барвників Е 122, Е 124, Е 133 у вихідних розчинах склала 12 10-4 моль/л, а барвника Е 102 – 25 10-3 моль/л.

1. *Приготування стандартних розчинів барвників Е 102, Е 122, Е 124 та Е 133.*

Для приготування стандартних розчинів Е 122, Е 124 та Е 133 з концентрацією барвника 6∙10-4 та 3∙10-4 моль/л у мірну колбу місткістю 10 мл внести відповідно 5.0 та 2.5 мл вихідного розчину з концентрацією 12∙10-4 моль/л та довести до мітки фосфатним буферним розчином з рН 6.0.

Для приготування стандартних розчинів Е 102 з концентрацією барвника 12.5∙10-3 та 6.25∙10-3 моль/л у мірну колбу на 10 мл внести відповідно 5.0 та 2.5 мл вихідного розчину з концентрацією 25∙10-3 моль/л та довести до мітки фосфатним буферним розчином із рН 6.0.

1. *Пробопідготовка.*

Стандартні розчини барвників і контрольні розчини змішати з 50% розчином гліцерину у співвідношенні 1 : 1. Розчин гліцерину з w = 50 % приготувати, змішавши гліцерин з дистильованою водою у співвідношенні 1 : 1.

1. *Проведення електрофорезу в агаровому гелі.*

За допомогою мікрошприца внести в лунки гелю по 10 мкл стандартних розчинів та розчинів проби. Після внесення кожного зразка промивають шприц буферним розчином для електрофорезу. У камеру для горизонтального електрофорезу «SE-2» поміщають гель, застиглий в рамці гелію, з нанесеними в лунки зразками. Камеру для електрофорезу заповнюють буферним фосфатним розчином з рН 6.0 так, щоб буферний розчин не заповнював лунки. Електропровідність забезпечують за допомогою фільтрувального паперу, змоченого в буфері для електрофорезу.

Закрийте кришку камери. Підключити камеру для електрофорезу до джерела живлення "Ельф-4", дотримуючись полярності. Барвники переміщаються від катода (негативно заряджений електрод) до анода (позитивно заряджений електрод). Включити джерело живлення та піддавати зразки електрофорезу протягом 2 годин при силі струму 400 мА та напрузі 200 В. При цьому стежити, щоб камера не перегрівалася.

Після використання мікрошприц промити етиловим спиртом.

Після закінчення електрофорезу вимкнути джерело струму, зняти кришку камери. Спостерігати аналітичний ефект необхідно протягом 30 хв після електрофорезу. Інтенсивність фарбування барвників у контрольному зразку візуально оцінити за колірною шкалою, побудованою за допомогою стандартних розчинів.

Вказати концентрації барвників у бікомпонентному контрольному розчині та розрахувати аліквоти розчинів барвників, внесених до контрольного розчину.