

◎ Exp 18 實驗操作注意事項 ◎

實驗以 SP20D(分光光度計)測量溶液吸收度，所以當注意比較每支試管的顏色。而此次實驗所有藥品中只有果糖及葡萄糖(兩者皆為產物)經過加熱處理後會顯現顏色，其他物質則維持透明無色，由於初產生之顏色太深，超過 SP20D 測量範圍，所以需再加入蒸餾水稀釋，降低其吸收度。此次實驗易犯的錯誤有因為藥品取量較少，不當或不精確的取液動作將會影響實驗結果的準確性，而忘記加熱使果糖及葡萄糖轉化成有顏色的物質，就直接加水稀釋，每支試管的顏色均為一樣，當然測量出來的吸收度亦為一樣，這是該有的觀念，此時實驗只能重作。因此以下所列出之實驗步驟注意事項，請務必確實注意及遵守，以利實驗能夠順利進行及避免實驗重作。

實驗步驟		注意事項																												
Part A (a)按照實驗課本所列之資料配製溶液，由於此部分目的在繪製檢量曲線圖，並未進行反應，因此可以一次將 6 支試管配製好。																														
<table border="1"><thead><tr><th>Run</th><th>Water (ml)</th><th>GFS (ml)</th><th>NaOH (ml)</th></tr></thead><tbody><tr><td>A0</td><td>3.0</td><td>0.0</td><td>2</td></tr><tr><td>A1</td><td>2.6</td><td>0.4</td><td>2</td></tr><tr><td>A2</td><td>2.3</td><td>0.7</td><td>2</td></tr><tr><td>A3</td><td>2.0</td><td>1.0</td><td>2</td></tr><tr><td>A4</td><td>1.8</td><td>1.2</td><td>2</td></tr><tr><td>A5</td><td>1.5</td><td>1.5</td><td>2</td></tr></tbody></table>			Run	Water (ml)	GFS (ml)	NaOH (ml)	A0	3.0	0.0	2	A1	2.6	0.4	2	A2	2.3	0.7	2	A3	2.0	1.0	2	A4	1.8	1.2	2	A5	1.5	1.5	2
Run	Water (ml)		GFS (ml)	NaOH (ml)																										
A0	3.0	0.0	2																											
A1	2.6	0.4	2																											
A2	2.3	0.7	2																											
A3	2.0	1.0	2																											
A4	1.8	1.2	2																											
A5	1.5	1.5	2																											
(b)將試管以 parafilm(封口膜)封好，避免隔水加熱時水份蒸發。事先以加熱鍋裝水加熱，待水沸騰，將 6 支試管連同試管架移至熱水中加熱約 5 分鐘，再移至室溫下冷卻，此時顏色變化如下圖。																														
		加熱的步驟不要忘了。																												
(c)待冷卻後加入 15mL 蒸餾水稀釋，搖晃均勻後，即可測量吸收度。		吸收度的測量可待 Part A 及 Part B 作完以後，由一位同學專門負責，其他同學則繼續進行 Part C。																												

Part B

(a)按照實驗課本所列之資料配製溶液，準備 6 支試管，先只加入 Enzyme，Water 及 Buffer，勿加入 Sucrose，注意實驗室所給之 Sucrose 濃度為 0.3M，必須另行以量瓶加水稀釋配製 0.03M Sucrose 備用。

Run	Enzyme (ml)	Water (ml)	Buffer (ml)	Sucrose (ml)
B1	1.0	0.50	0.5	1.00 (0.3M)
B2	1.0	0.75	0.5	0.75 (0.3M)
B3	1.0	1.00	0.5	0.50 (0.3M)
B4	1.0	0.50	0.5	1.00 (0.03M)
B5	1.0	0.75	0.5	0.75 (0.03M)
B6	1.0	1.00	0.5	0.50 (0.03M)

(b)當 0.03M Sucrose 配製好以後，即可開始加入 Sucrose 進行反應。此時，若 3 人一組的組別，可一人計時並負責注意及提醒同學加入試劑，一人負責加入 Sucrose 開始反應，另一人負責加入 NaOH 終止反應。

(c)此時準備好 1mL 0.3M 的 Sucrose 後加入 B1，馬上開始計時，碼錶從 0 開始，計時的同學除了負責注意時間，應將加入 Sucrose 的試管稍作搖晃幾秒鐘以混合均勻，然後交給負責加入 NaOH 的同學，置於另一個試管架上。而負責 Sucrose 的同學接著量取 0.75mL 0.3M Sucrose，當碼錶走至 1 分鐘時，加入 B2，間隔為 1 分鐘，依序將所有 6 支試管加入 Sucrose。

(d)負責 NaOH 的同學預先取 2mL NaOH，當碼錶走至 5 分鐘時，加入前述之 B1，計時的同學亦負責搖晃使之均勻，接下來再取 2mL NaOH，碼錶走至 6 分鐘時加入 B2。從加入 Sucrose 開始反應至加入 NaOH 終止反應，反應時間準確的控制 5 分鐘，若有延遲，應將確實的反應時間記錄下來。建議加入溶液的時間可如下表。

Run	加入 Sucrose	加入 NaOH
B1	0	5
B2	1	6
B3	2	7
B4	3	8
B5	4	9
B6	5	10

Sucrose 加入後即開始進行反應，因此必須等所有藥品準備好及同組同學負責的部份完成以後，再一起進行以下的步驟。

Sucrose 濃度有 0.3M 及 0.03M，所以必須事先準備好兩支乾淨的 1mL Pipette，切勿以同一支 pipette 量取不同濃度的溶液。

注意 B4~B6 Sucrose 的濃度為 0.03M 以及每支試管 Sucrose 必須量取的體積亦不同，此部分常犯錯。

(e)接下來重複 Part A 之(b)及(c)，各支試管顏色如下。



Part C

(a)以 B4 之溶液配製量來準備藥品，原要控制 5 個溫度來進行反應，由於室溫已有 B5，故不須再進行室溫的反應。

(b)準備 4 支試管，各加入 1mL Enzyme、0.5mL water 及 0.5mL Buffer。

(c)再取 4 支試管，各加入 1mL 0.03M Sucrose。

(d)各取(b)及(c)一支試管稱為一組共四組，分置於 4 個不同溫度的恆溫裝置中恆溫，分別約為 0°C、12°C、35°C 及 45°C，確實的溫度必須恆溫完成後以溫度計測量並記錄。

(e)恆溫完成後，將(b)試管之 2ml 溶液倒入(c)試管中進行反應，同時開始計時，搖晃數秒混合均勻後再置入恆溫裝置中，此時的溶液體積為 3ml，報告計算時必須注意。

(f)5 分鐘後，加入 2ml NaOH 終止反應，反應停止以後就不需再恆溫，可直接置於室溫。時間的控制必須準確，若有延遲，亦需將確實的反應時間記錄。

(g)當四個溫度都完成後，一起重複 Part A 之(b)及(c)

可在(b)的試管中插入溫度計測量溫度，而(c)的試管為反應物，則避免溫度計的插入移出而流失其內的溶液。偶而可將試管由恆溫裝置中移出搖晃以加速恆溫的完成。

恆溫裝置建議如下：

1. 0°C：取 250-mL 燒杯放入冰塊，加入少量水混合均勻。
2. 12°C：取恆溫杯放入半杯水，加入數塊冰塊攪拌至 12°C 左右，再將冰塊取出。
3. 35°C 及 45°C：加熱恆溫水槽。