|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ردیف** | **عنوان** | **توضیحات**  **نکته قابل توجه دانشجو** |
|  | به منظور آنالیز طیف­سنجی نشری برای ترکیب متیل اورانژ، با توجه به قابلیت فلورسانس ( **فلوروفور**) و کاربرد آن به عنوان معرف pH،مشخصات زیر **بر اساس منبع معتبر** ارائه شود.  ساختار شیمیایی متیل اورانژ:    حلال مناسب برای تهیه محلول آنالیز طیفی: ...  غلظت مناسب برای تهیه محلول آنالیز طیفی: ...  شرح روش تهیه محلول نمونه از متیل اورانژ:  مقدار ... گرم از پودر به فرم نمک ... از متیل اورانژ در ... میلی لیتر... به عنوان حلال وارد کرده، هم زده و سپس با استفاده از روش های ... محلول شفاف از متیل اورانژ به دست می آید.  **معرفی منبع معتبر مورد استفاده:** |  |
|  | برای متیل اورانژ در حلال ... با غلظت ... :  **در منبع معتبر**  طول موج ماکزیمم جذب (maxλ) ... نانومتر گزارش شده است.  **در منبع معتبر** طول موج یا طول موج های مناسب تحریک (excitation) برای دستیابی به نشر بهینه (اتیمم) از محلول آبی متیل­اورانژ ... نانومتر گزارش شده است.  **در منبع معتبر** طول موج­ های یا طول موج های مناسب نشر (emission) بهینه (اتیمم) ... نانومتر گزارش شده است.  **معرفی منبع معتبر مورد استفاده:** |  |
|  | در این آزمایشگاه استوک اولیه محلول نمونه از متیل اورانژ (**MO-stock**) با حجم ..10. میلی لیتر با غلظت ..0.05mg/mL.. در حلال .آب مقطر. تهیه شده، در اختیار کلاس قرار گرفت. |  |
|  | آشنایی با انواع دستگاه های طیف سنجی نشری در آزمایشگاه دستگاهی گروه شیمی دارویی:  **دستگاه اسپکتروفتومتری (PE)** **Perkin Elmer**  **دستگاه اسپکتروفتومتری**  **Multimode microplate reader: Bio Tek, Synergy HTX**  **دستگاه اسپکتروفتومتری**  **Multimode microplate reader: Infinite Tecan**  محل قرار گیری نمونه:  محل قرار گیری حلال به عنوان بلانک  مشاهده کووت مناسب برای دستگاه فلورسانس در اسپکتروفتومتری Perkin Elmer  \* تنوع کووت­های موجود شامل کووت کونیکال و کووت با رابط خروجی مشاهده شود.  حجم مناسب از محلول نمونه  حجم مناسب از محلول بلانک  محل قرار گیری منبع نور  مسیر عبور نور از محلول نمونه  نرم افزار مورد استفاده در دستگاه |  |
|  | محلول نمونه MO-stock و حلال مورد استفاده در تهیه این نمونه به عنوان بلانک برای مراحل طیف سنجی نشری به شرح زیر منظور شدند:  **در دستگاه اسپکتروفتومتری نشری** **(PE) Perkin Elmer**:  حجم ... میلی­لیتر از حلال مورد استفاده به عنوان بلانک در کووت (cuvvet) مناسب و قرارگیری در محل کووت:  حجم ... میلی­لیتر از محلول نمونه MO-stock در کووت (cuvvet) مناسب و قرارگیری در محل کووت:  **در دستگاه اسپکتروفتومتری پلیت ریدر BioTek Synergy HTX یا Infinite Tecan**:  حجم ... میکرو­لیتر از بلانک در خانه **G1** در پلیت 96 خانه (96-well plate)  حجم ... میکرو­لیتر از محلول نمونه MO-stock در خانه **G2** در پلیت 96 خانه |  |
|  | **یافتن طول موج ماکزیمم جذب از نمونه MO-stock:**  **اسکن** **طول موج جذب** برای **MO-stock** به روش **spectrum scan** به منظور یافتن **طول موج ماکزیمم جذب:**  6-1- با استفاده از دستگاه **اسپکتروفتومتری جذبی** **ماورابنفش (دستگاه pg یا Shimadzu):**  شرایط خوانش:  تعیین بازه طول موج: ... تا ... نانومتر  تعیین فاصله interval یا step بین طول موج ها در بازه تعیین شده: ... نانومتر  ذخیره برنامه خوانش در فلدر مرتبط  طول موج ماکزیمم جذب به دست آمده ... نانومتر می باشد.  6-2- با استفاده از دستگاه **اسپکتروفتومتری** **پلیت ریدر BioTek Synergy HTX** به روش **spectrum scan**:  شرایط خوانش:  تعیین بازه طول موج: ... تا ... نانومتر  دمای خوانش: قابلیت اجرا در دو دمای مستقل: 25 درجه سانتیگراد و 37 درجه سانتیگراد  شرایط نمونه برای پیش از خوانش: در دستگاه میکروپلیت ریدر امکان ... را برای نمونه قبل از خوانش نیز می توان در نظر گرفت.  تعیین فاصله interval یا step بین طول موج ها در بازه تعیین شده: ... نانومتر  ذخیره برنامه خوانش در فلدر مرتبط  طول موج ماکزیمم جذب به دست آمده ... نانومتر می باشد.  \* طول موج های به دست آمده در 6-1 و 6-2 را با یکدیگر و با طول موج ماکزیمم ارائه شده در منبع معتبر مقایسه نمایید.  **معرفی منبع معتبر مورد استفاده:** |  |
|  | **اسکن طول موج تحریکی (excλ) اپتیمم به منظور دستیابی به نشر در طول موج انتخابی برای نمونه MO-stock** با استفاده از دستگاه **اسپکتروفتومتری** **پلیت ریدر BioTek Synergy HTX**:  تعیین بازه طول موج تحریکی (excitation) (excλ): ... تا ... نانومتر  تعیین طول موج نشر (emission) (emλ) هدف با توجه به فیلترهای طول موجی در دسترس: ... نانومتر  تعیین slit برای بازه های تعیین شده: .. نانومتر  نتیجه به دست آمده شامل:  **λ exc : …nm obtained intensity of emission:** |  |
|  | **اسکن طول موج اپتیمم برای تحریک (excλ) و طول موج اپتیمم برای نشر (emλ)** **در نمونه MO-stock** با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری **فلورسانس PE و قابلیت Pre-Scan:**  تعیین بازه طول موج تحریکی (excitation) (excλ): ... تا ... نانومتر  تعیین بازه طول موج نشری (emission) (excλ): ... تا ... نانومتر  تعیین slit برای بازه های تعیین شده: .. نانومتر  تعیین سرعت اسکن: … nm/min  نتایج به دست آمده به شرح زیر:  **λ exc : …nm intensity:**  **λem : …nm intensity:**  طول موج های به دست آمده در این مرحله را با نتیجه ردیف های 7 و 8 و نیز با طول موج های ارائه شده در منبع معتبر مقایسه نمایید.  **معرفی منبع معتبر مورد استفاده:** |  |
|  | **اسکن طول موج تحریکی (excλ) اپتیمم برای دستیابی به نشراپتیمم (بهینه) در طول موج نشری هدف حاصل از ردیف 8 (Pre-Scan در دستگاه PE) در نمونه MO-stock یا حاصل از منبع معتبر برای MO-stock** با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری **فلورسانس : Infinite Tecan**  تعیین بازه طول موج تحریکی (excitation) (excλ): ... تا ... نانومتر  تعیین طول موج نشر (emission) (emλ) هدف: ... نانومتر  تعیین slit برای بازه تعیین شده: .. نانومتر  تعیین سرعت اسکن: … nm/min  اپتیمم طول موج تحریکی به دست آمده ... نانومتر با امکان نشر با شدت (intensity) ... بعد از احتساب بلانک می باشد.  **optimum λexc : … nm obtained intensity of emission:**  طول موج های به دست آمده در این مرحله را با نتیجه ردیف های 7 و 8 و نیز با طول موج های ارائه شده در منبع معتبر مقایسه نمایید.  **معرفی منبع معتبر مورد استفاده:** |  |
| **اگر شدت نشر در آزمون های های ردیف های 7 تا 9 در محدوده قابل گزارش می باشد، مراحل بعدی انجام شود.**  **در غیراین صورت از استوک اولیه رقیق سازی صورت گرفته مراحل ردیف های قبلی تکرار شود.** | |  |
|  | تهیه **چهار غلظت سریالی** از محلول استوک اولیه MO-stock (با غلظت (0.05 mg/mL در آب مقطر که قابلیت ثبت نشر در محدوده مناسب داشته، با استفاده از حلال ... تهیه شده، در اختیار کلاس قرار گرفت:  **غلظت­ 1mL /MO 0.0375 mg**  **غلظت­ MO X mg/1mL**  **غلظت­ 1mL /MO 0.01875 mg**  **غلظت­ MO 0.0125 mg/1mL** |  |
|  | **برای خوانش در دستگاه میکروپلیت ریدر Tecan:**  حجم ... میکرولیتر از هر یک از این غلظت های سریالی تهیه شده به ترتیب در خانه­ های **G3**، **G4** (غلظت X)، **G5** و **G6** در پلیت 96 خانه وارد شد. (ارجاع به صفحه آخر جدول آرایش پلیت مورد استفاده)  **برای خوانش در دستگاه PE:**  حجم ... میلی لیتر از هر یک از این غلظت های سریالی تهیه شده به توالی در کووت فلورسانس وارد شد. |  |
|  | **ارزیابی رفتار نشری و یافتن طول موج نشری (emλ) اپتیمم با استفاده از طول موج تحریکی اپتیمم به دست آمده درمرحله Pre-scan (ردیف ) برای نشر اپتیمم (بهینه) در نمونه های سریال غلظتی از MO** در دمای اتاق (25 درجه سانتیگراد) به روش **emission scan:**  12-1- با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری **فلورسانس PE** به روش  **emission scan:**  **تعیین بازه طول موج نشری (emission) (emλ): ... تا ... نانومتر**  **تعیین طول موج تحریکی ( excλ) اپتیمم به دست آمده از مرحله Pre-Scan در ردیف 9 (310 و 577 نانومتر): ... نانومتر**  **تعیین slit برای بازه تعیین شده برای emλ: .. نانومتر**  **بر اساس فایل خروجی حاصل به موارد زیر پاسخ دهید:**  12-1-الف- طول موج نشری اپتیمم به دست آمده برای هر یک از غلظت های آزمون شده را بنویسید.  12-1- ب- منحنی استاندارد نشر برای هر یک از غلظت های مطالعه شده را با احتساب بلانک (رابطه شدت نشر ماکزیمم نسبت به غلظت) رسم نمایید.  **معادله منحنی**  **شیب خط**  **ضریب همبستگی (R)**  **فایل خروجی Excel پردازش شده پیوست شود.**  12-2- با استفاده از دستگاه **اسپکتروفتومتری** **پلیت ریدر Infinite Tecan**به روش **emission scan:**  **تعیین بازه طول موج نشری (emission) (emλ): ... تا ... نانومتر**  **تعیین طول موج تحریکی (excλ) اپتیمم به دست آمده از مرحله Pre-Scan در ردیف 9(310 و 577 نانومتر): ... نانومتر**  **تعیین slit برای بازه تعیین شده برای emλ: .. نانومتر**  **بر اساس فایل خروجی حاصل به موارد زیر پاسخ دهید:**  12-2-الف- طول موج نشری اپتیمم به دست آمده برای هر یک از غلظت های آزمون شده را با احتساب بلانک بنویسید.  12-2- ب- منحنی استاندارد نشر برای هر یک از غلظت های مطالعه شده را با احتساب بلانک (رابطه شدت نشر ماکزیمم نسبت به غلظت) رسم نمایید.  **معادله منحنی**  **شیب خط**  **ضریب همبستگی (R)**  **فایل خروجی Excel پردازش شده پیوست شود.** |  |
|  | **نتایج به دست آمده در 12-1 و 12-2 را با هم مقایسه نمایید.** |  |
|  | **ارزیابی رفتار نشری اپتیمم در بازه طول موج تحریکی (excλ) در طول موج نشری به دست آمده درمرحله Pre-scan (ردیف ) برای نشر اپتیمم (بهینه) در نمونه های سریال غلظتی از MO** در دمای اتاق (25 درجه سانتیگراد) با استفاده از دستگاه **اسپکتروفتومتری** **پلیت ریدر BioTek Synergy** به روش **single point:**  **تعیین بازه طول موج تحریکی (excλ): ... تا ... نانومتر**  **تعیین طول موج نشر (emλ) هدف با توجه به فیلترهای فراهم شده در دستگاه: ... نانومتر**  **تعیین slit برای بازه تعیین شده برای excλ: .. نانومتر**  طول موج تحریکی **(excλ)** اپتیمم برای نشر در طول موج نشری هدف ... به دست آمد.  شدت نشر در طول موج نشری اپتیمم ... به دست آمد.  **بر اساس فایل خروجی حاصل به موارد زیر پاسخ دهید:**  الف- طول موج تحریکی اپتیمم به دست آمده را با طول موج تحریکی اپتیمم به دست آمده در ردیف های 7 تا 9 مقایسه نمایید.  **فایل خروجی Excel پردازش شده پیوست شود.**  **معرفی منبع معتبر مورد استفاده:** |  |
|  | با **ارجاع به فایل خروجی Excel** شدت نشر ماکزیمم برای هر یک از محلول­های منیل اورانژ با غلظت های **سریالی**  **1mL/MO-0.05mg، 1mL/MO-0.0375mg، MO-X، 1mL/MO-0.01875-1mg و 1mL/MO-0.0125 mg** را با احتساب بلانک محاسبه نموده، با یکدیگر مقایسه نمایید.  **فایل خروجی Excel پردازش شده پیوست شود.** |  |
|  | برای نمونه مجهول از متیل اورانژ MO-X یک بار با استفاده از منحنی و بار دیگر با استفاده از معادله استاندارد غلظت را محاسبه و گزارش نمایید.  **فایل خروجی Excel پردازش شده پیوست شود.** |  |
|  | بر اساس نسبت شدت نشر بین غلظت­های مطالعه شده معلوم، حدود درصد خطای اندازه­گیری نشر در خروجی هر یک از دو دستگاه PE و پلیت ریدر Tecan را محاسبه و گزارش نمایید. |  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **A1**  **Solvent as Blank** | **A2**  **MO-**  **..mg/mL** | **A3**  **MO-**  **…mg/mL** | **A4**  **MO-**  **…mg/mL** | **A5**  **MO-**  **… mg/mL** | **A6**  **MO-**  **X mg/mL** | **A7** | A8 | A9 | A10 | A11 | A12 |
| B |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| F |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| G |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |