|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **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 بلانکمشاهده 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 نمونهحجم مناسب از محلول بلانک محل قرار گیری منبع نور مسیر عبور نور از محلول نمونهنرم 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 مرتبططول 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 سانتیگرادشرایط 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 مرتبططول 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 ... نانومترتعیین طول موج نشر (emission) (emλ) هدف با توجه به فیلترهای طول موجی در دسترس: ... نانومترتعیین slit برای بازه های تعیین شده: .. نانومترنتیجه 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 ... نانومترتعیین بازه طول موج نشری (emission) (excλ): ... تا ... نانومترتعیین slit برای بازه های تعیین شده: .. نانومترتعیین سرعت اسکن: … nm/minنتایج 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 ... نانومترتعیین طول موج نشر (emission) (emλ) هدف: ... نانومترتعیین slit برای بازه تعیین شده: .. نانومترتعیین سرعت اسکن: … nm/minاپتیمم 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 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |