บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การสังเคราะห์ คุณลักษณะและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก(III)-เหล็ก(II) และสังกะสี(III)-สังกะสี(II) กับลิแกนด์พอลิเดนเตท มีเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

การจำแนกประเภทจุลินทรีย์

เป็นการจัดประเภทของจุลินทรีย์สิ่งสำคัญจะต้องรู้จักลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์นั้น ซึ่งจะต้องศึกษาจากจุลินทรีย์ชนิดเดียว โดยศึกษาเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์นั้น ๆ คือ เป็นกลุ่มเชื้อ (Culture) เพราะว่าจุลินทรีย์มีขนาดเล็กมากเมื่อศึกษาเป็นกลุ่มเชื้อแล้วก็เท่ากับศึกษาจุลินทรีย์ชนิดเดียว กลุ่มที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียวเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (Pure Culture) ลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาเพื่อจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ ได้แก่

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) โดยดูจากขนาด รูปร่าง โครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากแต่ละเซลล์มีขนาดเล็กมากมีหน่วยเป็นไมโครเมตร การศึกษาต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายประมาณ 1,000 เท่า

2. องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (Chemical Composition) เซลล์ของจุลินทรีย์นั้นจะประกอบด้วยสารอินทรีย์แตกต่างกันมากมาย เช่น มีลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผนังเซลล์เป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มี หรือแบคทีเรียแกรมบวกมีสารกรดไทโคอิก (Teichoic acid) ที่ผนังเซลล์ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบไม่มีผนังเซลล์

3. ลักษณะของการเลี้ยงเชื้อ (Cultural Characteristics) จุลินทรีย์บางชนิดต้องการสารอาหารแตกต่างกัน บางชนิดเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ บางชนิดเลี้ยงในอาหารที่มีแต่สารอนินทรีย์ บางชนิดต้องการสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล วิตามิน โคเอนไซม์ บางชนิดต้องการซีรัม เซลล์เม็ดเลือด เพปโทน และสารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น

4. ลักษณะทางเมตาบอลิซึม (Metabolic Characteristics) กระบวนการดำรงชีวิตของเซลล์เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า เมตาบอลิซึม ปฏิกิริยานี้จะแตกต่างตามชนิดของจุลินทรีย์

5. ลักษณะทางแอนติเจน (Antigenic Characteristics) องค์ประกอบของเซลล์เป็นแอนติเจนซึ่งเมื่อเข้าเซลล์สัตว์อื่นจะกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่เป็นซีรัมโปรตีนไปจับกับแอนติเจนนั้น แอนติบอดีมีความจำเพาะกับแอนติเจนที่กระตุ้น และแอนติเจนมีแตกต่างกันมากมาย ดังนั้นแอนติบอดีที่สร้างขึ้น จึงใช้ช่วยในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้

6. ลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic Characteristics) สารพันธุกรรมเป็น DNA 2 สาย (Double-Strand) มีลักษณะคงที่ และช่วยในการจัดหมวดหมู่ชนิดของจุลินทรีย์โดยศึกษาจากองค์ประกอบของเบสของ DNA (DNA Base Composition) และลำดับ (Sequence) ของนิวคลีโอไทด์เบสใน DNA

7. ความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ถึงแม้จะมีจุลินทรีย์จำนวนไม่มากที่ทำให้เกิดโรค แต่จุลินทรีย์บางชนิดทำให้เกิดโรคกับสัตว์ พืช หรือจุลินทรีย์อื่น ๆ

8. ลักษณะทางนิเวศวิทยา (Ecological Characteristics) ถิ่นที่อยู่ของจุลินทรีย์ มีความสำคัญในการบอกลักษณะของจุลินทรีย์นั้น ๆ

สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus* ; *S. aureus*)

สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (*S. aureus)* เป็นแบคทีเรีย ที่มีลักษณะกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองหรือสีทอง เจริญเติบโตได้ดีในสภาพมีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต คือ 35-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH หรือความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ที่ 7-7.5

ที่มาของ สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส

เชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส จะมีชีวิตอยู่ได้ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหารและนม หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้โดยจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ หรือ เส้นผมและผิวหนังถึง 50% หรือมากกว่านี้ในคนที่มีสุขภาพดี และอาจพบเชื้อชนิดนี้ 60-80 % สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่งก็คือ การเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมเป็นผลให้อาหารที่มีการปนเปื้อนอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อและสร้างสารพิษได้อย่างรวดเร็ว

การเข้าสู่ร่างกาย

เชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส เข้าสู่ร่างกายได้จากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน อาหารที่มักพบ เชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส ปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัดเช่น ไข่ ทูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย เอแคลร์ ช็อกโกแลต แซนวิช และผลิตภัณฑ์นม ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน

อันตรายของ สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส

สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ คือ เอนเทอโรทอกซินซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดี และเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ สารพิษชนิดนี้ทนความร้อนถึงระดับ 143.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาทีได้ ดังนั้นอุณหภูมิในการหุงต้มธรรมดาหรืออุณหภูมิ

น้ำเดือดจึงไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้ ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติดเชื้อนั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็วและรุนแรงในหลายๆ กรณี ซึ่งอาการทั่วไปของผู้ได้รับเชื้อที่พบคือผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลียในผู้ป่วย บางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน

เชื้อเอสเชอริเชียโคไล (*Escherichia coli* ; *E. coli*)

เชื้ออีโคไล (*E. coli*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน (Gram Negative Rod) อยู่ในกลุ่มเอ็นเทอโรแบคทีเรียซี (Family Enterobacteriaceae) ปกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น พบเป็นจำนวนมากในอุจจาระ แต่ไม่พบในปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้ทำให้ อีโคไลมีความสำคัญ ในการตรวจเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยใช้เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) ที่บ่งบอก ว่าผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลหรือไม่ในภาวะร่างกายปกติ เชื้ออีโคไลไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะก่อให้เกิดโรคได้ในกรณีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือในสภาวะที่ร่างกายอ่อนแอ เรียกว่า เชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic Pathogen) ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Secondary Infection)

ที่มาของ เชื้ออีโคไล

กลุ่มผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อที่สำคัญคือ ผู้ที่ต้องทำงานเกี่ยวข้องกับเชื้อโรค ทำให้เกิดการติดเชื้อจากการทำงาน (Occupational Infection) ได้แก่ บุคลากรทางการแพทย์ที่สัมผัสกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ และผู้ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ซึ่งต้องสัมผัสกับสารคัดหลั่งจากร่างกายผู้ที่ติดเชื้อ เป็นต้น เชื้ออีโคไลทำให้เกิดการตัดเชื้อโดยเกาะกับผนังเซลล์ของอวัยวะส่วนต่าง ๆ เช่น ไต กระเพาะปัสสาวะ และจะสร้างสารช่วยในการยึดเกาะให้เชื้ออยู่ในบริเวณนั้นได้ และจะสร้างสารต่างๆ ออกมาเพื่อทำลายเซลล์ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อขึ้น เชื้ออีโคไลทำให้เกิดกลุ่มอาการที่สำคัญ คือ การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารก และท้องร่วง การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ (Urinary Tract Infection: UTI) เกิดจากเชื้ออีโคไลที่อาศัยอยู่ ในลำไส้ และอุจจาระ โดยเชื้อสามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณทางเดินปัสสาวะขึ้นไปยังกระเพาะปัสสาวะ หรือไตได้ จากนั้นจะมีการแบ่งตัวของเชื้ออย่างรวดเร็วที่อวัยวะดังกล่าว ทำให้เกิดภาวะพบแบคทีเรียในปัสสาวะ (Bacteriuria) โดยสายพันธุ์ของเชื้ออีโคไลที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะจะสร้างสารเอ็กซ์ แอดอีซินส์ (X adhesins) ช่วยในการยึดเกาะให้เชื้ออยู่บริเวณทางเดินปัสสาวะได้ และเชื้อจะสร้างสารฮีโมไลซิน (Hemolysin) เพื่อทำลายเซลล์ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ต่างๆ แตก โดยผู้ที่ติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะจะมีอาการปวดแสบบริเวณถ่ายปัสสาวะ มีอาการปวดท้อง เสียดท้องขณะปัสสาวะ ปัสสาวะบ่อย และรู้สึก เหมือนปัสสาวะไม่สุด การรักษาการ ติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะโดยการให้ยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เช่น กลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) อย่างน้อย 7 วัน ร่วมกับการพยายามปรับสภาพปัสสาวะให้เป็นกรด

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial Culture Media)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบธรรมดา (Basic nutrient Media)

1. เพปโทน คือโปรตีนซึ่งถูกย่อยแล้วได้เป็นกรดอะมิโน และ Simple Nitrogenous Compounds โดยใช้กรด ด่าง หรือ เอนไซม์ คุณสมบัติของเพปโทน จะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของคุณภาพโปรตีนที่ใช้ และวิธีการย่อยโปรตีน (ด้วยกรด ด่างหรือ เอนไซม์) การย่อยด้วยกรดหรือด่าง จะทำลายวิตามินและกรดอะมิโน บางส่วนในโปรตีนไปซึ่งผิดกับการย่อยด้วยเอนไซม์ โปรตีนซึ่งใช้ในการผลิตเพปโทนมีหลายชนิด เช่น เคซีน (โปรตีนในน้ำนม) เจลลาติน เนื้อ ถั่วเหลือง และ Yeast Cells เป็นต้น เพปโทนเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียต้องการมากสำหรับการเจริญเติบโต

2. Infusion และ Extracts เป็นสารสกัดจากเซลล์ต่าง ๆ ทั้งจากจุลชีพ (เช่น Yeast Extract ซึ่งความเป็นจริงถือว่าเป็นเพปโทนชนิดหนึ่ง) เนื้อเยื่อจากพืช (เช่น Malt Extract) และจากสัตว์ (เช่น Beef Extract Brain-Heart Infusion) เป็นซึ่งใช้แทนเพปโทนก่อนที่จะมีการคิดค้นการผลิตเพปโทนขึ้นมาใช้งานซึ่งในปัจจุบันก็ยังคงใช้อยู่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด Infusion และ extract นี้เป็นสารสกัดซึ่งมีส่วนประกอบไม่แน่นอนและไม่ชัดเจน โดยเป็นสารผสมระหว่างโปรตีน พอลิเพปไทด์ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต รวมถึงวิตามิน และ Growth Factors หลายชนิด

3. Solidifying Agents เป็นสารซึ่งใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้อาหารชนิดนั้นๆ แข็งตัว และกลายเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สารพวกนี้ได้แก่ วุ้น เจลลาติน ซิลิกาเจล และ Polyacrylic Gels แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ วุ้น ซึ่งเป็นพอลิแซคคาร์ไรด์ ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายสีแดง (Rhodophyceae) วุ้นที่ดีควรสะอาดปราศจากฝุ่นผงต่างๆ ละลายที่ 80 องศาเซลเซียส เมื่อเตรียมวุ้นความเข้มข้น 2% ในน้ำ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วทิ้งให้แข็งตัว สิ่งที่ได้ควรจะใสหรือหากขุ่นก็เพียงเล็กน้อย

4. อินดิเคเตอร์ (Indicators) ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมักจะมีอินดิเคเตอร์ 2 ประเภท คือ

4.1 อินดิเคเตอร์ เพื่อบอกสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่ง ได้แก่ Phenol Red, Bromothymol Blue, Bromocresol Purple, Neutral Red, Litmus, Andrade's Indicator เป็นต้น

4.2 อินดิเคเตอร์ เพื่อบอกสภาวะ Oxidation- Reduction Potential (E_h) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น เมทิลลีนบูล (Methylene Blue) และ Resazurin เป็นต้น

5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ใช้เติมลงไปเพื่อปรับปริมาณ Osmotic Pressure ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น Isotonic สำหรับเซลล์แบคทีเรีย หรือเพื่อปรับความเข้มข้นของเกลือของอาหารเลี้ยงเชื่อให้เป็นไปตามที่แบคทีเรียต้องการ

6. เดกโตรส (Dextrose) ใช้เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอน และพลังงานแก่แบคทีเรีย

7. น้ำ ใช้เพื่อทำให้ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในรูปของสารละลายที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ ส่วนใหญ่จะใช้น้ำกลั่น (Distilled water)

8. Selective Agent เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียบางชนิด เจริญได้เท่านั้น โดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะถูกยับยั้งไม่ให้เจริญ การใส่ Selective Agent ลงในอาหาร เลี้ยงเชื้อนี้ จะมีประโยชน์ในการแยกเชื้อซึ่งเป็นตัวก่อโรคออกจากเชื้อที่ไม่ก่อโรค Selective Agents ที่ใช้กันมีหลายชนิด ได้แก่สีย้อมบางชนิด เช่น Crystal Violet และ Brilliant Green (ใช้ยับยั้งการเจริญ ของแบคทีเรียพวกแกรมบวก) โซเดียมคลอไรด์ (ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก *Staphylococcus spp.* เนื่องจากไม่สามารถทนเกลือได้ในปริมาณสูงๆ เหมือน *Staphylococcus spp.*), Sodium Azide, Sodium Citrate, Sodium Tellurite, Sodium Lauryl Sulfate, Sodium Selenite, Iodine, Phenyl Ethanol และยาปฏิชีวนะต่างๆ เป็นต้น นอกจากนั้นการปรับความ เป็นกรดหรือด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ต่ำกว่าปกติ (เช่น pH 5.6 ใน Abouraud Dextrose Agar) หรือสูงกว่าปกติ (เช่น pH 8.8-9.0 ใน Alkaline Peptone Water สำหรับแยกเชื้อ *Vibrio cholerae*) ก็ สามารถใช้เป็น Selective Character ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

9. Reducing Agent เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยส่งเสริมให้เกิดภาวะไร้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น สารเหล่านี้ได้แก่ Ascorbic Acid, Sodium Thioglycolate, Sodium Formaldehyde Sulfoxylate, Thiomalic Acid, Sodium Hydrosulfite และ Cysteine เป็นต้น

10. เลือด ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Enriched Media เลือดที่ใช้โดยมากมี 4 ชนิด คือ

- เลือดแกะ ซึ่งเอาไฟบรินออกแล้ว (Defibrinated Sheep Blood) เป็นเลือดที่ดีที่สุดเพราะให้ Hemolysis ได้ถูกต้องชัดเจน โดยเฉพาะ Hemolysis ที่เกิดจาก *Streptococci spp.*

- เลือดกระต่าย ซึ่งเอาไฟบรินออกแล้ว คุณภาพรองจากเลือดแกะ และให้ Hemolysis ได้ถูกต้องเช่นกัน

- เลือดม้า ซึ่งเอาไฟบรินออกแล้ว ให้ Hemolysis ไม่ถูกต้องโดยเฉพาะจาก *Streptococci* แต่มีประโยชน์ในการใช้ใส่ใน Mueller Hinton Media เพื่อการทดสอบความไวของ แบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพโดยใส่ในรูปของเลือดม้าที่ทำให้แม็ดเลือดแดงแตก

- เลือดคน ซึ่งหมดอายุแล้วจากคลังเลือด เป็นเลือดที่ใช้มากที่สุดเพราะหาง่าย ราคาถูก แต่อาจมีผลเสียจาก Citrate, Antimicrobial Agents และสารอื่นๆ ที่อยู่ในเลือด ซึ่งอาจทำให้แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้หรือให้ปฏิกิริยา Hemolysis ที่ผิดจากความเป็นจริง

เทคนิคการวัดโซนใส (Disc Diffusion Techniques)

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีซึ่งสามารถปฏิบัติง่าย สะดวก และรวดเร็ว รวมทั้งสามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้อง การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบนกระดาษกรอง (Filter Paper Disc) ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ จะแพร่จากจุดเริ่มต้น ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเมื่อระยะทางที่สารแพร่

ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารนั้นจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่างๆกันรอบแผ่นกระดาษกรอง ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใดๆ (ไกลกระดาษกรอง) ก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษกรองซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใส (Inhibition Zone) ขึ้นอัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใด ผลการยับยั้ง จุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของโซนใสโดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration หรือ MIC)

เนื่องจากเคมีชีวอนินทรีย์มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยและไฮโดรไลซ์ในร่างกายของมนุษย์ โดยมีเหล็ก สังกะสี และทองแดงเป็นองค์ประกอบในสารประกอบเมทัลโลเอนไซม์ มันจะทำงานได้ดีในสภาพความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่จะเป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติที่ดี มีสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้ ทำหน้าที่เป็น active site

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์เกี่ยวกับสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชันกับลิแกนด์พอลิเดนเตท ดังนี้

Guddat, Twitchett และคณะ (1999) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กกับ Uteroferrin โดยมีโลหะคู่เป็น Fe(III)/Fe(II) พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนนี้มีสีชมพูและมีสมบัติเป็นเมทัลโลเอนไซม์

Twitchett และคณะ (2002) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กโดยมี Fe(III)/Fe(II) เป็นโลหะคู่ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (Active site) ของโลหะเอนไซม์ชนิด Pig Purple Acid Phosphatase คณะผู้วิจัยได้นำ Mn(II), Ni(II), Cu(II) และ Zn(II) ไปแทนที่ Fe(II) จากนั้นได้นำสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชันทั้ง 5 ชนิดที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาการไฮโดรไลซ์กับฟอสเฟต

Horn และคณะ (2001) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก $(Fe_4(\mu\text{-btppnol})_2(\mu\text{-O})_2(\mu\text{-OAc})_2](BPh_4)_2 \cdot CH_3CN(H_2O)_{1/2}(MeOH)_{1/2}$ เพื่อใช้เป็นแบบจำลองสำหรับโพลีนิวเคลียร์ของเหล็กเอ็นไซม์ พบว่าตำแหน่งการเข้าโคออร์ดิเนตของลิแกนด์กับโลหะมีความแตกต่างกัน สารประกอบเชิงซ้อนนี้มีสมบัติทางแม่เหล็กเป็นแบบแอนตีเฟอโรแมกเนติก

Neves และคณะ (1996) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กคู่ 2 ชนิด ได้แก่ $[Fe^{III}Fe^{II}(BBPMP)(\mu\text{-OAc})_2]ClO_4 2H_2O$ และ $Fe_2^{III}Fe^{II}(BBPMP)(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-OH})ClO_4$ พบว่า Fe(III)/Fe(II) ทำหน้าเป็นตำแหน่งที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาของ Purple Acid Phosphatases โดยมีหมู่อะซิเตตเชื่อมโยง Fe(III)

และFe(II) เข้าด้วยกัน สารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 2 ชนิดนี้ จะมีบริเวณที่สามารถให้เอ็นไซน์เข้าไปเชื่อมโยงและอยู่ในสถานะออกซิไดซ์และรีดิวซ์ได้ (เมื่อ BBPMP เป็นไอออนลบของ 2,6–bis[2-hydroxy-benzyl)(2-pyridylmethyl)amiomelthyl]-4-melthylphenol)

Trukhan และคณะ (2000) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[Fe_2O(L)_2(H_2O)](ClO_4)_2$ และ $Fe_2O(L)(BzO)]ClO_4$ ขึ้น (เมื่อ L= หมู่คาร์บอกซิลเลต) เมื่อมีหมู่คาร์บอกซิลเลตทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมเหล็กทั้ง 2 อะตอม ก็ทำให้โมเลกุลนี้เสมือนหนึ่งเป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติที่เป็นต้นแบบของ active site ของโปรตีนในร่างกายมนุษย์ และสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทั่ว ๆ ไปได้

Smith และคณะ (2008) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนชนิดโลหะคู่แตกต่างกันแต่มีลิแกนด์ที่เหมือนกัน เช่น การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ Fe^{III}/Zn^{II} กับลิแกนด์ 2- bis{[(2-pyridylmethyl)-aminomethyl]-6-[2-hydroxy-benzyl)(2-pyridylmethyl)]aminomethyl}-4-methylphenol สารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้ก็เพื่อเป็น active site ของ uteroferrin และได้นำสารประกอบนี้มาหาความสามารถของการเป็น active site โดยเปรียบเทียบความสามารถกับสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ Ga^{III}/Zn^{II} ที่มีลิแกนด์เป็นชนิดเดียวกัน พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ Ga^{III}/Zn^{II} มีความว่องไวในการเร่งปฏิกิริยามากกว่า

Rebecca และคณะ (2008) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสังกะสี-สังกะสีเป็นโลหะคู่ 2 ชนิด ได้แก่ $[Zn_2(HL_1)(CH_3COO)](PF_6)\cdot H_2O$ และ $Li[Zn_2(HL_1)]_4(PO_4)_2(PF_6)_3\cdot(CH_3OH)$ เพื่อเป็นแบบจำลองในการศึกษาความเป็น active site กับเอนไซม์ฟอสโฟเอสเทอเรส (phosphoesterases) ผู้วิจัยได้ใช้ bis(4-nitrophenyl)phosphate (bNPP) เป็นซับสเตรต พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโลหะคู่ของสังกะสี-สังกะสีนี้ทำหน้าที่เป็น active site ที่ดี และให้ค่า k_{cat} = 1.26 ± 0.06 × 10^{-6} s^{-1}. (เมื่อH_3L_1= [2-((2-hydroxy-3-(((2-hydroxyethyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-5-methylbenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetic acid])

Smith และคณะ (2008) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ของทองแดง คือ $[Cu_2(BPMP)(OAc)_2]\cdot(ClO_4)xH_2O$ พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนที่มีโลหะคู่ของทองแดงนี้ทำหน้าที่เป็น active site เช่นกัน ซึ่งให้ค่า k_{cat} = 15 +/- 1.5 min(-1), K(M) = 6.4 +/- 1.8 mM (เมื่อ H-BPMP = 2,6-bis[bis(pyridin-2-ylmethylamino)methyl]-4-methylphenol)

Xavier และคณะ (2009) ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ 2 ชนิดคือ Fe^{III}/Co^{II} และ Ga^{III}/Co^{II} สารประกอบเชิงซ้อนนี้คือ $[Fe^{III}Co^{II}(BPBPMP)(\mu\text{-}OAc)_2]\cdot(ClO_4)$ และ $[Ga^{III}Co^{II}(BPBPMP)(\mu\text{-}OAc)_2]\cdot(ClO_4)$ จากนั้นได้นำสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 2 ชนิดนี้มาเป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติ เพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์กับซับสเตรตชนิด bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate พบว่าที่ตำแหน่งที่มีโลหะคู่ได้ทำหน้าที่เป็น active site (เมื่อ H_2BPBPMP คือ (2-bis[{(2-pyridyl-methyl)-aminomethyl}-6-{(2-hydroxy-benzyl)-(2-pyridyl-methyl)}-aminomethyl]-4-methylphenol)

Anob และคณะ(2011) ได้สังเคราะห์สารประกอบเตตระเมอร์ของเหล็ก $[Fe_4(HPBA)_2(\mu\text{-}CH_3COO)_2(\mu\text{-}O)(\mu\text{-}OH)(OH_2)_2]ClO_4 \cdot 5H_2O$ เพื่อเป็นคะตะลิสต์เป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติเพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลต์กับ 2,4-bis(dinitrophenylphosphate) ซึ่งเป็นซับสเตรต โดยมีโลหะคู่ คือ เหล็ก ทำหน้าที่เมทัลโลเอนไซมีพบว่ามีค่า $k_{cal} = 1.6\ (\pm 0.2) \times 10^{-3}\ s^{-1}$ มีค่า pk_a 3 ค่า คือ 5.3 , 6.2 และ 8.4 และค่า $K_m = 7.4 \pm 0.6$ mM

จากงานที่กล่าวมาทั้งหมด จะเห็นได้ว่าสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่สังเคราะห์ขึ้นดังกล่าว จะมีโลหะคู่เป็นบริเวณ active site ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเมทัลโลเอนไซม์ของโปรตีนได้ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จะสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่มีลิแกนด์แบบมัลติเดนเตต ซึ่งเป็นโลหะเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นเมทัลโลเอนไซม์ของโปรตีนได้ โดยสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคู่ที่จะสังเคราะห์มี 2 ชนิด คือ Fe^{III}/Fe^{II} และ Fe^{III}/Zn^{II} และที่สำคัญคือสารประกอบเชิงซ้อนที่จะสังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยนี้ จะสามารถนำไปเป็นแบบจำลองเลียนแบบธรรมชาติของเมทัลโลเอนไซม์ในห้องทดลอง และใช้ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการไฮโดรไลซ์โปรตีน ตลอดจนจะสามารถนำสารประกอบเชิงซ้อนโลหะเอนไซม์ที่ได้ไปศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ต่อไปได้