

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

การสังเคราะห์ คุณลักษณะและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก(III)-เหล็ก(II) และสังกะสี(III)-สังกะสี(II) กับลิแกนด์พอลิเดนเตท มีวัสดู อุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือที่ใช้ และวิธีการศึกษา ดังนี้

#### วัสดู และอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. หลอดหยด
3. แท่งแก้วคนสาร
4. กระจกนาฬิกา
5. จุกยาง
6. ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร
7. ช้อนตักสาร
8. พาราฟิล์ม
9. กระดาษฟิเอช
10. เตาอบ
11. เตาให้ความร้อน
12. ขวด ไวอัล
13. หลอดทดลอง
14. น้ำกลั่น
15. แท่งแม่เหล็กคนสาร
16. กระดาษกรอง
17. ชุดรีฟลักซ์สาร
18. ขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร
19. ปิเปตขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
20. อะลูมิเนียมฟอยล์
21. เครื่องชั่งสารเคมี ความละเอียด 4 ตำแหน่ง

#### สารเคมี

1. 2,6-bis(hydroxymethyl)-4-methyl phenol;  $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_2\text{OH})_2\text{OH}$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 168.19 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ 95.0% บริษัท Sigma - Aldrich

2. Chloroform ;  $\text{CHCl}_3$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 119.38 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์  $\geq 99.9\%$  บริษัท Sigma - Aldrich

3. 1-(3-aminopropyl)imidazole ;  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 125.17 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์  $\geq 97.0\%$  บริษัท Sigma - Aldrich

4. 2-Pyridine carboxaldehyde ;  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 107.11 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์  $\geq 99.0\%$  บริษัท Sigma - Aldrich

5. Sodium perchlorate ;  $\text{NaClO}_4$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 122.44 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์  $\geq 99.8\%$   
บริษัท Sigma - Aldrich
6. เอทานอล (Ethanol ;  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) มวลโมเลกุลเท่ากับ 46.07 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความ  
บริสุทธิ์  $\geq 99.5\%$  บริษัท Sigma - Aldrich
7. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid ;  $\text{HCl}$ ) มวลโมเลกุลเท่ากับ 36.46 กรัมต่อโมล เกรด ACS  
reagent บริษัท Sigma - Aldrich
8. Potassium hydroxide ;  $\text{KOH}$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 56.11 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent บริษัท  
Sigma - Aldrich
9. Salicylaldehyde ;  $2\text{-(HO)C}_6\text{H}_4\text{CHO}$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 122.12 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์  $\geq$   
98.0 % บริษัท Sigma - Aldrich
10. Dichloromethane ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 84.93 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความ  
บริสุทธิ์  $\geq 99.7\%$  บริษัท Sigma - Aldrich
11. Sodium hydrogen carbonate ;  $\text{NaHCO}_3$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 84.01 กรัมต่อโมล เกรด ACS  
reagent ความบริสุทธิ์  $\geq 99.5\%$  บริษัท Sigma - Aldrich
12. Anhydrous sodium sulfate ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 142.04 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent  
ความบริสุทธิ์  $\geq 99.0\%$  บริษัท Sigma - Aldrich
13. Sodium borohydride ;  $\text{NaBH}_4$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 37.83 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์  $\geq 99.0\%$   
บริษัท Sigma - Aldrich
14. Sodium acetate trihydrate ;  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 136.18 กรัมต่อโมล เกรด  
ACS reagent ความบริสุทธิ์  $\geq 99.0\%$  บริษัท Sigma - Aldrich
15. Triethylamine ;  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 101.19 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความ  
บริสุทธิ์  $\geq 99.8\%$  บริษัท Sigma - Aldrich
16. เมทานอล (Methanol ;  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) มวลโมเลกุลเท่ากับ 32.04 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent  
ความบริสุทธิ์  $\geq 99.8\%$  บริษัท Sigma - Aldrich
17. 2-aminomethylpyridine ;  $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 108.14 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ 99.0  
% บริษัท Sigma - Aldrich
18. Ferrous chloride tetrahydrate ;  $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 198.81 กรัมต่อโมล ความ  
บริสุทธิ์ 99.0% บริษัท Sigma - Aldrich
19. Ferric chloride hexahydrate ;  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 270.30 กรัมต่อโมล ความ  
บริสุทธิ์ 97.0% บริษัท Sigma - Aldrich

20. Zinc acetate dehydrate ;  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 219.51 กรัมต่อโมล ความบริสุทธิ์ 99.99 % บริษัท Sigma – Aldrich

### เครื่องมือที่ใช้

1. ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FT-IR) ยี่ห้อ Perkin Elmer เตรียมโดยวิธีอัดสารตัวอย่างเป็นแผ่น (Disc) โดยผสมสารตัวอย่างกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วนำไปวิเคราะห์ในช่วงเลขคลื่น  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$

2. เครื่องวิเคราะห์หามวลโมเลกุล ด้วยเครื่อง Liquid Chromatograph – Mass Spectrometer โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธี Electro spray ionisation (ESI)

3. อุลตราไวโอเลต - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis) ยี่ห้อ Shimadzu UV - 1601 เตรียมสารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นนำไปวิเคราะห์ในช่วงแสงที่ตามองเห็น (Visible) ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 - 800 นาโนเมตร

### วิธีการทดลอง

#### ตอนที่ 1 การสังเคราะห์สารประกอบ 2-[(3-pyrazol-1-yl-propylamino)-methyl]-phenol (1)

1-(3-aminopropyl)imidazole 3.57 กรัม ละลายใน 1 M KOH จากนั้นเติมละลายละลายดังกล่าวลงใน Salicylaldehyde 3.19 มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลายเอทานอล 50 มิลลิลิตร คนสารละลาย 15 นาที จะได้สารละลายที่เหลืองปน จากนั้นเติมสารละลายเมทานอลลงไป 30 มิลลิลิตร คนสารละลายต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเติม Sodium borohydride จำนวน 2.00 กรัม ทำการเติมที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส คนสารละลายเป็นเวลา 20 นาที ทำการปรับ pH ของสารละลายให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วย Glacial acetic acid นำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน ได้ตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนสีขาวมาผสมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายชั้นอินทรีย์มาสกัดด้วย Sodium hydrogen carbonate อิมตัว จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายชั้นอินทรีย์มาเติม Anhydrous sodium sulfate กรองสารละลายที่ได้และนำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้สารประกอบ 2-[(3-pyrazol-1-yl-propylamino)-methyl]-phenol

#### ตอนที่ 2 การสังเคราะห์สารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol (2)

2,6-bis(hydroxymethyl)-4-methyl phenol 5.00 กรัม ละลายในละลายละลายกรดไฮโดรคลอริก 36% คลอโรฟอร์ม 100 มิลลิลิตร คนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่

ได้มาทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร เติม anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้สารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol

### ตอนที่ 3 การสังเคราะห์สารประกอบ 2,2'-Dipicolamine (3)

2-(Aminomethyl)pyridine 2.7 กรัม ละลายใน 1 M KOH จากนั้นเติมละลายละลายดังกล่าวลงใน 2-Pyridine carboxaldehyde 2.7 กรัม ที่ละลายอยู่ในสารละลายเอทานอล 50 มิลลิลิตร คนสารละลาย 30 นาที จะได้สารละลายที่เหลืองขุ่น จากนั้นเติมสารละลายเมทานอลลงไป 30 มิลลิลิตร คนสารละลายต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเติม Sodium borohydride จำนวน 2.00 กรัม ทำการเติมที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส คนสารละลายเป็นเวลา 20 นาที ทำการปรับ pH ของสารละลายให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วย Glacial acetic acid นำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน ได้ตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนสีขาวมาผสมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายชั้นอินทรีย์มาสกัดด้วย Sodium hydrogen carbonate อิมตัว จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายชั้นอินทรีย์มาเติม Anhydrous sodium sulfate กรองสารละลายที่ได้และนำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน ได้สารประกอบ 2,2'-Dipicolamine

### ตอนที่ 4 การสังเคราะห์สารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl-4-methyl-phenol [H<sub>2</sub>L]

นำ 2,6-bis(chloromethyl)-4-methyl phenol, 2-[(3-pyrazol-1-yl-propylamino)-methyl]-phenol และ 2,2'-Dipicolamine (ที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1-3) ละลายในตัวทำละลายอะซิโตนในไครท์ จำนวน 40 มิลลิลิตร เติม  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  จำนวน 75 มิลลิกรัม คนสารละลายที่ได้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายมาระเหยตัวทำละลาย นำสารที่ได้มาเติม Sodium hydrogen carbonate อิมตัว ทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 25 มิลลิลิตร นำสารละลายชั้นอินทรีย์มาเติม Anhydrous sodium sulfate กรองสารละลายที่ได้และนำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้สารประกอบ ได้สารประกอบ 2-[(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-methyl]-6-[(2-hydroxy-benzyl)-(4-imidazol-1-yl-butyl)-amino]-methyl-4-methyl-phenol

ตอนที่ 5 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน  $M_1M_2L$  เมื่อ  $M_1$  คือ Fe(II) , Fe(III) และ  $M_2$  คือ Fe(III) , Zn(II)

สารประกอบเชิงซ้อน 1 เตรียมดังนี้ นำลิแกนด์ HL 0.08 กรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล จำนวน 20 มิลลิลิตร เติม  $FeCl_2 \cdot 6H_2O$  0.05 กรัม และ  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  จำนวน 0.04 กรัม จะได้สารละลายสีม่วงดำ จากนั้นเติม  $CH_3COONa \cdot H_2O$  0.11 กรัม คนสารละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติม  $NaClO_4$  0.08 กรัม คนเป็นเวลา 30 นาที เติม KOH เข้มข้น 1 โมลาร์ คนสารละลายต่ออีก 5 นาที คนสารละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กรองสารละลายตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องจะปรากฏผงสีม่วงของ  $[Fe^III Fe^II(L)(\mu-O)(H_2O)_2](ClO_4) \cdot H_2O$  (1) ส่วนสารประกอบเชิงซ้อน 2 เตรียมได้จากการเปลี่ยน  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  เป็น  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  จะปรากฏผงสีม่วงน้ำตาลของ  $[Fe^III Zn^II(L)(\mu-O)(H_2O)](ClO_4)$  (2)

ตอนที่ 2 วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กและสังกะสีกับลิแกนด์มัลติเดนเตต มีเครื่องมือ ดังนี้

นำสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กและสังกะสีกับลิแกนด์มัลติเดนเตตในแต่ละการทดลอง มาศึกษาสมบัติทางกายภาพด้วยเครื่องมือต่าง ๆ ดังนี้

1. ฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ ศึกษาลักษณะการสั่นพ้องในสารตัวอย่าง และบอกหมู่ฟังก์ชันที่ได้จากการเลขคลื่น (Wavenumber ;  $cm^{-1}$ )
2. เครื่องวิเคราะห์หามวลโมเลกุล ด้วยเครื่อง Liquid Chromatograph – Mass Spectrometer โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธี Electro spray ionisation (ESI)
3. อัลตราไวโอเลต - วิสเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV - Vis) ช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร

ตอนที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของลิแกนด์และสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1. การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

ใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ต้องในปริมาณที่เหมาะสม โดยทั่วไปนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียปริมาณ  $10^5$ - $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิธีการเตรียมมีดังนี้

- 1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่ใช้ในอาหารเหลว

Nutrient agar ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่ป่มไว้มาปรับความ  
 ขุ่นของการเจริญเติบโตให้มีค่าความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFaland (McFaland standard) เบอร์  
 0.5

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน McFaland มีดังนี้

- นำสารละลาย A (ละลายเบเรียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต 1.175 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร) ปริมาตร 1  
 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลาย A ที่เจือจางลง 10 เท่านี้ ปริมาตร 0.5  
 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B (ละลาย  $H_2SO_4$  เข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในน้ำ 99 มิลลิลิตร) ปริมาตร  
 99.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีนำไปใส่ในหลอดฝาเกลียว ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดให้แน่น เก็บ  
 ในที่ที่มีอุณหภูมิใช้งาน 6 เดือน ชนิดของหลอดแก้วที่ใส่สารละลายนี้ควรเป็นชนิดเดียวกับหลอดเชื้อ  
 แบคทีเรีย เพื่อจะได้เปรียบเทียบความขุ่นกันได้ และก่อนใช้ต้องเขย่าสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน  
 (บุษกร อุดรภิชาด. 2549 : 258)

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

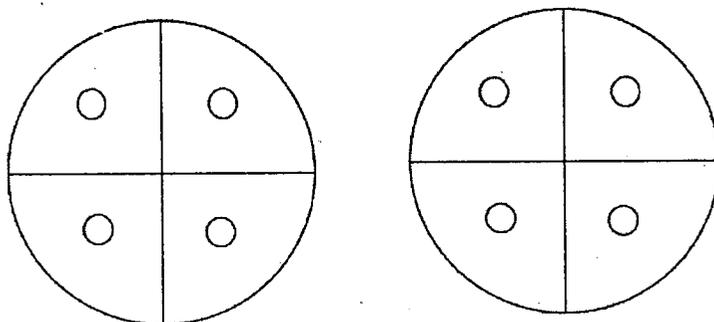
ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบแข็ง โดยวิธี Agar diffusion โดยใช้อาหาร  
 Nutrient agar (NA) หรือ beef peptone agar โดยเทอาหารที่เตรียมได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหาร  
 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนก้นจาน และฝาจาน เท่ากับ 9 และ 10 เซนติเมตร ตามลำดับ จากนั้นวางทิ้ง  
 ไว้ให้อาหารในจานเพาะเชื้อแข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิธีการนี้จะได้อาหารแข็งที่มีความหนา 4 เซนติเมตร  
 (บุษกร อุดรภิชาด. 2549 : 121)

3. การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อน

นำสารประกอบเชิงซ้อนรวมทั้งสารตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง นำมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น  
 ต่าง ๆ คือ 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร ใช้ตัวทำละลาย คือ เมทานอล  
 (MeOH) เป็นตัวทำละลาย ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย และค่า  
 เบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard derivation; SD)

4. วิธีศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ของสารประกอบ  
 เชิงซ้อนสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้

4.1 เขียนที่จานอาหารแข็ง เพื่อระบุตำแหน่งที่จะวางแผ่นกระดาษตาปลาขนาด  
 เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตำแหน่งที่จะวางแผ่นกระดาษตาปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

4.2 วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารทดสอบ ใช้ไม้พินสำลีที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความชุ่มไว้โดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 105–107 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วบิดให้แห้งพอหมาด ๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้นทำการกวาดให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยลากผ่านเส้นศูนย์กลางจานเพาะเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้าแล้วหมุนจานเพาะเชื้อไปประมาณ 60 องศาแล้วป้ายเช่นกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 3 - 5 นาทีเพื่อให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

4.3 การทดสอบสารตั้งต้น และสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้กระดาษตาปลาปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบ (Forceps) คีบกระดาษวางบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นแล้วกดเบา ๆ มาวางที่ตำแหน่งที่กำหนดไว้

4.4 หยดตัวอย่างสารตั้งต้น และสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้วางใส่ในแผ่นกระดาษตาปลาคนละตำแหน่งตามลำดับ ตำแหน่งละ 20 ไมโครลิตร รวมทั้งหยดตัวทำละลายน้ำเป็นตัวควบคุม (Control) โดยการใช้นิโครปิเปตต์อัตโนมัติ (Automatic Pipette) ที่ปราศจากเชื้อ เสร็จแล้วนำจานเพาะเชื้อนี้ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น (Inhibition Zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

4.5 การอ่านผล เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ให้วัดขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้น โดยวัดจากขอบโซนข้างหนึ่งไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของกระดาษตาปลาด้วยบันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ขอบโซนที่วัดต้องเป็นโซนใสที่ชัด ถ้ามีเชื้อขึ้นบ้าง ให้ถือว่าบริเวณนั้นยังมีปริมาณสารตั้งต้น หรือสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้) (อมรรัตน์ สีสูกอง และคณะ. 2550 : 33)