



Rozprawa doktorska

**Wpływ podstawników na właściwości kompleksujące
antybiotyków β -laktamowych z grupy penicylin
z jonami wybranych metali**

**Influence of substitutes on the complexing properties of
 β -lactam antibiotics from the penicillin group
with selected metal ions**

Justyna Elżbieta Frymark

Promotor: prof. dr hab. Renata Jastrząb

Promotor pomocniczy: dr Michał Zabiszak

Praca wykonana w Zakładzie Chemii Koordynacyjnej
Wydziału Chemii UAM w Poznaniu

Poznań, 2026

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojej Promotorce **prof. dr hab. Renacie Jastrzęb** za nieocenione wsparcie naukowe, cierpliwość, życzliwość oraz inspirację do nieustannego poszerzania horyzontów, zarówno tych naukowych, jak i tych, które przypominają, że najciekawsze cele osiąga się krok po kroku. Dziękuję za wspólny naukowy maraton, pełen ambitnych celów, wyzwań i satysfakcji z przekraczania kolejnych etapów. Za wskazówki, które pozwalały nie tylko odnajdywać właściwy kierunek, ale również czerpać radość z samej drogi. Dziękuję za przykład, jak szybować wysoko, nie tracąc z oczu tego, co naprawdę ważne.

Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do mojego Promotora Pomocniczego **dr Michała Zabiszaka** za merytoryczne wsparcie, konstruktywne uwagi oraz gotowość do dzielenia się wiedzą na każdym etapie realizacji badań. Dziękuję za pomoc w pokonywaniu kolejnych okrążeń prowadzących do ukończenia tej rozprawy, za umiejętność utrzymywania właściwego tempa oraz za przekonanie, że nawet po trudniejszych etapach warto walczyć do końca, bo o mistrzostwie decydują wytrwałość, konsekwencja i wiara w osiągnięcie celu. Dziękuję również za to, że w tej naukowej podróży zawsze znalazło się miejsce na odrobinę magii.

Najgłębsze podziękowania składam mojej ***Rodzinie i Przyjaciółom***. Dziękuję Wam za towarzyszenie mi w tej wyjątkowej podróży, za cierpliwość, pomoc, wiarę we mnie oraz motywację do sięgania po więcej. Dziękuję za to, że wspólnie odkrywaliśmy nowe horyzonty, celebrowaliśmy każdy osiągnięty cel i przypominaliście mi, że najpiękniejsze podróże to nie tylko te prowadzące do wyznaczonego miejsca, ale przede wszystkim te, które odbywa się z właściwymi ludźmi. Dziękuję za inspirujące rozmowy, wspólnie spędzony czas i nietuzinkowy humor, dzięki którym nawet najbardziej wymagające dni nabierały właściwej perspektywy.

Na zakończenie pragnę podziękować wszystkim, którzy w jakikolwiek sposób przyczynili się do powstania tej rozprawy. Jestem wdzięczna za każdą życzliwość, inspirację i wsparcie, które stały się częścią tej niezwykłej drogi.

Spis treści

Ankieta dorobku naukowego	5
Streszczenie	17
Abstract	19
Wykaz stosowanych skrótów	21
1. Wprowadzenie	22
1.1 Historia antybiotyków	22
1.2 Charakterystyka antybiotyków	24
1.3 Antybiotyki β -laktamowe z grupy penicylin	28
1.4 Jony metali o znaczeniu biologicznym lub diagnostycznym	31
1.5 Związki kompleksowe antybiotyków	35
2. Metody badawcze	41
2.1 Miareczkowanie potencjometryczne	41
2.2 Techniki spektroskopowe stosowane w badaniach związków kompleksowych	43
3. Cel pracy	46
4. Omówienie wyników	47
4.1 Związki kompleksowe ampicyliny (A1) – Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies	47
4.2 Związki kompleksowe amoksycyliny (A2) - Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin	56
4.3 Związki kompleksowe kloksacyliny i dikloksacyliny (A3) - Metal–Antibiotic Interactions: Potentiometric and Spectroscopic Investigation of Cloxacillin and Dicloxacillin Complexes in Aqueous Solution	63
5. Podsumowanie i wnioski	71
6. Bibliografia	74
7. Przedruk publikacji składających się na cykl artykułów rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami	88

Ankieta dorobku naukowego

Artykuły zawarte w rozprawie doktorskiej

- A1** **Frymark, J.***; Zabiszak, M.; Grajewski, J.; Tylkowski, B.; Jastrząb, R.
Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies.
Int. J. Mol. Sci. **2025**, *26*, 7605.
<https://doi.org/10.3390/ijms26157605>
[IF =4,900, MNiSW = 140]
- A2** **Frymark, J.***; Zabiszak, M.; Ogawa, K.; Jastrząb, R.
Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin.
J. Mol. Liq. **2026**, *444*, 129190.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.129190>
[IF =6,000, MNiSW = 100]
- A3** **Frymark, J.***; Zabiszak, M.; Kaczmarek, M. T.; Jastrząb, R.
Metal–Antibiotic Interactions: Potentiometric and Spectroscopic Investigation of Cloxacillin and Dicloxacillin Complexes in Aqueous Solution. *Sci. Rep.* **2026**.
<https://doi.org/10.1038/s41598-026-55267-5>
[IF =3,900, MNiSW = 140]

Artykuły niewchodzące w skład dysertacji

1. Zabiszak, M.; **Frymark, J.**; Skrobańska, M.; Kaczmarek, M. T.; Jastrząb, R.
Reactions of Lanthanide Ions with Glycolic Acid or Tartaric Acid in the Presence of Spermine: Potentiometric and Spectroscopic Studies.
Int. J. Mol. Sci. **2025**, *26*, 4477.
<https://doi.org/10.3390/ijms26104477>
[IF =4,900, MNiSW = 140]

2. Zabiszak, M.; **Frymark, J.**; Grajewski, J.; Jastrząb, R. Spectroscopic Studies of Lanthanide(III) Complexes with L-Malic Acid in Binary Systems.
Int. J. Mol. Sci. **2024**, *25*(17), 9210.
<https://doi.org/10.3390/ijms25179210>
[IF =4,900, MNiSW = 140]
3. Zabiszak, M.; **Frymark, J.**; Ogawa, K.; Skrobańska, M.; Nowak, M.; Jastrząb, R.; Kaczmarek, M. T. Complexes of β -Lactam Antibiotics and Their Schiff-Base Derivatives as a Weapon in the Fight against Bacterial Resistance.
Coord. Chem. Rev. **2023**, *493*, 215326.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215326>
[IF =20,600, MNiSW = 200]
4. Skrobańska, M.; Zabiszak, M.; Taras-Goslinska, K.; Nowak, M.; Kaczmarek, M. T.; **Frymark, J.**; Michalska, D.; Jastrząb R. Potentiometric and spectroscopic studies of the complex formation in the 6-methyl-2-thiouracyl and copper(II) ion system,
Polyhedron **2022**, *223*, 115964. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115964>
[IF =2,600, MNiSW = 100]
5. **Frymark, J.**; Zabiszak, M.; Grajewski, J.; Hnatejko, Z.; Kołodyńska, D.; Kaczmarek, M. T.; Jastrząb, R. Excess of Polyamine as a Factor Influencing the Mode of Coordination in the Eu(III)/ α -Hydroxy Acid/Spermine System.
Polyhedron **2022**, *221*, 115853. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115853>
[IF =2,600, MNiSW = 100]
6. Zabiszak, M.; **Frymark, J.**; Nowak, M.; Grajewski, J.; Stachowiak, K.; Kaczmarek, M.T.; Jastrząb, R. Influence of d-Electron Divalent Metal Ions in Complex Formation with L-Tartaric and L-Malic Acids.
Molecules **2021**, *26*, 5290. <https://doi.org/10.3390/molecules26175290>
[IF =4,927, MNiSW = 140]

Analiza bibliometryczna

Sumaryczny współczynnik IF	55,327
Średni współczynnik IF	6,147
Sumaryczne punkty	1200
Całkowita liczba cytowani	102
Indeks Hirscha	4

Źródło Scopus, dostęp 2.07.2026 r.

Rozdziały w monografiach

1. **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrząb, R. Związki kompleksowe oksacyliny z jonami metali – badania potencjometryczne oraz spektroskopowe, w monografii pt. „Nauka i przemysł - lubelskie spotkania studenckie” ISBN 978-83-68741-34-6, Lublin 2026, UMCS – rozdział w monografii
2. **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrząb, R. Potencjometryczne oraz spektroskopowe badania związków kompleksowych ampicyliny, w monografii pt. „Nauka i przemysł - lubelskie spotkania studenckie” ISBN 978-83-227-9806-5, Lublin 2024, UMCS – rozdział w monografii
3. **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrząb, R. Kwas jabłkowy jako czynnik kompleksujący jony lantanowców(III), w monografii pt. „Nauka i przemysł - lubelskie spotkania studenckie” ISBN 978-83-227-9701-3, Lublin 2023, UMCS – rozdział w monografii
4. **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrząb, R. Wpływ nadmiaru sperminy na tworzenie związków kompleksowych jonów europu(III), w monografii pt. „Nauka i przemysł - lubelskie spotkania studenckie” ISBN 978-83-227-9603-0, Lublin 2022, UMCS – rozdział w monografii
5. **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrząb, R. Detekcja związków kompleksowych jonów europu(III) z kwasem jabłkowym oraz sperminą, w monografii pt. „63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego Książka Abstraktów” ISBN 978-83-60988-32-9, Warszawa 2021, Polskie Towarzystwo Chemiczne – rozdział w monografii
6. **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrząb, R. Termodynamiczne i spektroskopowe badania związków kompleksowych kwasu jabłkowego z jonami metali w układach podwójnych, w monografii pt. „Nauka i przemysł-lubelskie spotkania studenckie” ISBN 978-83-227-9503-3, Lublin, wrzesień 2021, UMCS – rozdział w monografii

Staż naukowe

30.08.-5.09.2026 Janina, Grecja	Mieszany Program Intensywny (BIP) w ramach programu Erasmus+ University of Ioannina, <i>Temat stażu: Metal Ions in Life and Health: From Chemistry to Medicine</i>
12-26.04.2026 Rzym, Włochy	Staż badawczy w ramach programu ID–UB Sapienza University of Rome, Chemistry Department Opiekun naukowy: prof. Ilaria Fratoddi <i>Temat stażu: Surface Functionalization of Gold Nanoparticles with Complexes of β-Lactam Antibiotics: A Feasibility Study</i>
8.05.-8.10.2025 Kanazawa, Japonia	Staż badawczy w ramach programu Erasmus+ Kanazawa University, Graduate School of Medical Sciences Opiekun naukowy: prof. Kazuma Ogawa <i>Temat stażu: Metal complexes for cancer theranostics</i>
23.04.-7.05.2025 Kanazawa, Japonia	Staż badawczy w ramach programu ID–UB Kanazawa University, Graduate School of Medical Sciences Opiekun naukowy: prof. Kazuma Ogawa <i>Temat stażu: Comprehensive Spectroscopic Analysis of Electronic and Structural Properties of β-Lactam Antibiotic Complexes</i>
20.02.-4.03.2024 Tarragona, Hiszpania	Staż badawczy w ramach programu ID–UB Chemical Technology Unit in Eurecat Opiekun naukowy: dr Bartosz Tylkowski <i>Temat stażu: Advanced Encapsulation of β-Lactam Antibiotic Complexes</i>
11-14.02.2020 Tarragona, Hiszpania	Wyjazd studyjny w ramach programu ID–UB Chemical Technology Unit in Eurecat Dow Chemical Iberrica Tarragona

Projekty i konkursy

- 203/13/UAM/0099 Konkurs: „Badania doktoranckie- badania oraz szkolenia i warsztaty międzynarodowe” program „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (ID–UB)
Tytuł projektu: Surface Functionalization of Gold Nanoparticles with Complexes of β -Lactam Antibiotics: A Feasibility Study
- 158/13/UAM/0107 Konkurs: „Badania doktoranckie- badania oraz szkolenia i warsztaty międzynarodowe” program „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (ID–UB)
Tytuł projektu: Comprehensive Spectroscopic Analysis of Electronic and Structural Properties of β -Lactam Antibiotic Complexes
- 148/06/POB3/0014 Konkurs: „Wsparcie udziału naukowców i doktorantów w prestiżowych konferencjach naukowych - Konferencje na terenie Europy” program „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (ID–UB)
- 115/13/UAM/0045 Konkurs: „Badania doktoranckie- badania oraz szkolenia i warsztaty międzynarodowe” program „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (ID–UB)
Tytuł projektu: Advanced Encapsulation of β -Lactam Antibiotic Complexes
- 102/13/SNŚ/0022 Konkurs: „Minigrant doktorancki”, program „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (ID–UB)
Tytuł projektu: Badania termodynamiczne oraz spektroskopowe związków kompleksowych antybiotyków β -laktamowych
- 009/34/UAM/0024 Konkurs: „Study@Research - Indywidualny projekt badawczy”, program „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (ID–UB)
Tytuł projektu: Detekcja związków kompleksowych jonów europu(III) z kwasem jabłkowym oraz sperminą

Konferencje naukowe

Konferencje międzynarodowe:

- 28.06-3.07.2026 **Frymark, J.**; Zabiszak, M.; Jastrząb, R.
Odense, Dania *Complexation of β -lactam antibiotics with metal ions of biological relevance: a potentiometric and spectroscopic approach*
46th International Conference on Coordination Chemistry
Poster
- 10-11.05.2025 **Frymark, J.**; Zabiszak, M.; Jastrząb, R.
Online *Coordination Chemistry of Copper Ions with β -Lactam Antibiotics: A Potentiometric and Spectroscopic Studies*
Natural Science Baltic Conference 2025
Poster Communication
- 25-29.08.2024 **Frymark, J.**; Zabiszak, M.; Jastrząb, R.
Münster, Niemcy *Interaction of Aminopenicillin with Metal Ions: Complex Formation Studies*
17th European Biological Inorganic Chemistry Conference
Poster
- 28.08-2.09.2022 **Frymark, J.**; Zabiszak, M.; Jastrząb, R.
Rimini, Włochy *Detection of complex formation in the Eu(III)/ α -hydroxy acids/spermine system*
44th International Conference on Coordination Chemistry
Poster

Konferencje krajowe:

- 19.06.2026
Lublin **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrzab, R.
Związki kompleksowe oksacyliny z jonami metali – badania potencjometryczne oraz spektroskopowe
XIV Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie”
Komunikat
- 25.06.2025
Poznań **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrzab, R.
Interaction of β -Lactam Antibiotics with Metal Ions: Equilibrium and Spectroscopic Studies
„Forum Doktoranckie” w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych UAM
Komunikat
- 12-13.04.2025
Warszawa **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrzab, R.
Związki kompleksowe kloksacyliny i dikloksacyliny z jonami Cu(II) i Eu(III) - badania potencjometryczne oraz spektroskopowe
II Warszawskie Sympozjum Chemiczne „W ProbUWce”
Komunikat
- 01.02.2025
Online **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrzab, R.
Związki kompleksowe amoksycyliny badania potencjometryczne oraz spektroskopowe
Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk Ścisłych i Przyrodniczych „Bio Idea 5.0”
Poster
- 15-20.09.2024
Poznań **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrzab, R.
Właściwości kompleksów antybiotyków β -laktamowych z jonami metali bloku f: badania potencjometryczne oraz spektroskopowe
66. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego PTChem
Poster i Flash Presentation
- 3.06.2024
Lublin **Frymark, J.;** Zabiszak, M.; Jastrzab, R.
Potencjometryczne oraz spektroskopowe badania związków kompleksowych ampicyliny

XII Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie”

Komunikat

26.06.2023

Lublin

Frymark, J.; Zabiszak, M.; Jastrzab, R.

Kwas jabłkowy jako czynnik kompleksujący jony lantanowców(III)

XI Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie”

Komunikat

27.06.2022

Lublin (Online)

Frymark, J.; Zabiszak, M.; Jastrzab, R.

Wpływ nadmiaru sperminy na tworzenie związków kompleksowych jonów europu(III)

X Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie”

Poster

10.06.2022

Poznań

Frymark, J.; Zabiszak, M.; Jastrzab, R.

Detekcja związków kompleksowych jonów europu(III) z kwasem jabłkowym oraz sperminą

V Poznańskie Sympozjum Młodych Naukowców

Komunikat

13-17.09.2021

Łódź (Online)

Frymark, J.; Zabiszak, M.; Jastrzab, R.

Detekcja związków kompleksowych jonów europu(III) z kwasem jabłkowym oraz sperminą

63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego PTChem

Poster

28.06.2021

Lublin (Online)

Frymark, J.; Zabiszak, M.; Jastrzab, R.

Termodynamiczne i spektroskopowe badania związków kompleksowych kwasu jabłkowego z jonami metali w układach podwójnych

IX Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie”

Poster

Konferencje jako współautor:

- 28.06-3.07.2026 Zabiszak, M.; **Frymark, J.**; Kaczmarek, M.T.; Jastrząb, R.
Odense, Dania *Exploring the coordination chemistry of cefadroxil with transition and lanthanide metal ions*
 46th International Conference on Coordination Chemistry
- 22-26.09.2025 Jastrząb, R.; Kaczmarek, M.T.; Zabiszak, M.; **Frymark, J.**;
Wrocław Skrobańska, M.; Nowak, M.
Chemia kompleksów lantanowców: możliwości, ograniczenia i kierunki rozwoju
 67. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego PTChem
- 22-26.09.2025 Jastrząb, R.; **Frymark, J.**; Kaczmarek, M.T.; Zabiszak, M.;
Wrocław Skrobańska, M.; Nowak, M.
Kompleksy metali z antybiotykami β -laktamowymi – perspektywy i wyzwania
 67. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego PTChem
- 18-20.09.2023 Nowicka, A.; **Frymark, J.**; Zabiszak, M.; Jastrząb, R.;
Warszawa *Badania termodynamiczne związków kompleksowych metali bloku d z kloksacyliną*
 Sympozjum Młodych Naukowców
- 18-22.09.2023 Kaczmarek, M.T.; **Frymark, J.**; Zabiszak, M.; Nowak, M.;
Toruń Jastrząb, R.
Kompleksy antybiotyków β -laktamowych jako broń w walce z opornością bakterii
 65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego PTChem
- 11-14.06.2023 Zabiszak, M.; **Frymark, J.**; Jastrząb, R.
Janina, Grecja *Detection of the level of biogenic amines by complexes of lanthanides ions*
 16th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (16-ISABC)

Nagrody i wyróżnienia

- Finalistka II etapu „Konkurs Wielkopolska dla Planety 2030” edycja 2026
- Stypendium Fundacji UAM dla Doktorantów na rok akademicki 2025/2026
- Zespołowa Nagroda Rektora UAM za osiągnięcia naukowe, II Stopnia 2024
- Medal dla absolwentów UAM „Za wybitne osiągnięcia w nauce i wyróżniający udział w życiu Uniwersytetu” (2022)
- Nagroda za najlepszą pracę magisterską obronioną na Wydziale Chemii UAM 2022
- Stypendium Ministra Edukacji i Nauki za znaczące osiągnięcia na rok akademicki 2021/2022
- Stypendium Rektora UAM w latach 2018/2019, 2019/2020 oraz 2021/2022

Działalność popularyzatorska i organizatorska

- Jury konkursu ChemTakLab (2026)
- Pomoc przy organizacji 34. Zjazdu Stowarzyszenia Nauczycieli Nauk Przyrodniczych w Poznaniu, 13-15.03.2026
- Praca w biurze Zjazdu 66. Zjazdu Polskiego Towarzystwa Chemicznego PTChem, 15-20.09.2024
- Tłumaczenie książki zlecone przez Wydawnictwo Naukowe PWN pt.: „Inorganic chemistry” autorstwa Marka Wellera, Tiya Overton, Jonathana Rourke’a i Frasera Armstronga wydanej przez Oxford University Press (2023/2024)
- Festiwal Filmu Chemicznego CINEMA TO CHEMIA (2022, 2023, 2024, 2026)
- Chemiczne Mikołajki (2023, 2024, 2025)
- Noc Naukowców (2023, 2024)
- Dzień Kandydata na Wydziale Chemii UAM (2018, 2019, 2023, 2024)
- Poznański Festiwal Nauki i Sztuki (2018, 2021, 2022, 2023, 2024)
- Targi wodorowe H2Poland, Poznań (2022)
- Obchody Stulecia Uniwersytetu Poznańskiego (2019)
- Targi edukacyjne (2019)

Kursy i szkolenia

- Skaningowa mikroskopia elektronowa w praktyce (2026)
- High-Performance Leadership: Lessons from F1 (2025)
- Szkolenie Santander Sztuczna inteligencja (AI) dla każdego (2025)
- Zarządzanie danymi badawczymi dla naukowców - kurs podstawowy (2024)
- Zarządzanie danymi badawczymi dla naukowców - kurs średnio zaawansowany (2024)
- Szkolenie antydyskryminacyjne dla doktorantów UAM (2023)
- How to get patents in healthcare – kurs (2024)
- „Audytor wewnętrzny systemu ISO 9001” (2020)
- „Główny technolog – zarządzanie produktem chemicznym” (2020)
- „From the laboratory to the industry” (2020)
- „Innowacyjne zastosowanie nieorganicznych związków chemicznych” (2019)
- „Kreowanie innowacyjnego produktu z komponentów ekologicznych” (2019)

Działalność samorządowa

- Wiceprzewodnicząca Rada Samorządu Studentów Wydziału Chemii ds. wewnętrznych 2021/2022
- Rada ds. Kształcenia Szkoły Nauk Ścisłych (przedstawiciel studentów Wydziału Chemii 2020/2021, 2021/2022)
- Rada Programowa Wydziału Chemii UAM (przedstawiciel studentów II stopnia 2021/2022)
- Pełnomocnik ds. Dydaktycznych Rady Samorządu Studentów Wydziału Chemii
- Rada Samorządu Studentów Wydziału Chemii (członek 2019/2020, 2020/2021, 2021/2022)

Najważniejsze osiągnięcia

- Współautorstwo w 9 publikacjach z listy filadelfijskiej
- Laureatka Stypendium Fundacji UAM dla Doktorantów na rok akademicki 2025/2026
- Realizacja zagranicznych staży naukowych w Hiszpanii, Japonii oraz Włoszech
- Udział w krajowych (11) i międzynarodowych (4) konferencjach naukowych
- Tłumaczenie specjalistycznej książki akademickiej z zakresu chemii nieorganicznej dla Wydawnictwa Naukowego PWN (2023/2024)
- Kierowanie 5 projektami badawczymi finansowanymi w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (ID–UB)
- Medal UAM za wybitne osiągnięcia w nauce i działalności uniwersyteckie (2022)
- Stypendium Ministra Edukacji i Nauki za znaczące osiągnięcia naukowe (2021/2022)

Streszczenie

Antybiotyki należą do najważniejszych grupy leków stosowanych we współczesnej medycynie i odgrywają kluczową rolę w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Szczególne miejsce zajmują antybiotyki β -laktamowe z grupy penicylin, które charakteryzują się szerokim zastosowaniem terapeutycznym oraz zróżnicowaną budową chemiczną. Obecność licznych grup funkcyjnych w strukturze tych związków umożliwia ich oddziaływanie z jonami metali, co może z kolei wpływać na ich właściwości fizykochemiczne, trwałość, biodostępność oraz aktywność biologiczną antybiotyków. Poznanie procesów kompleksowania antybiotyków jest istotne dla lepszego zrozumienia mechanizmów wpływających na ich właściwości chemiczne i biologiczne, a także może mieć znaczenie w projektowaniu nowych układów o potencjalnym zastosowaniu farmaceutycznym czy diagnostycznym.

W rozprawie doktorskiej przeprowadzono analizę związków kompleksowych antybiotyków β -laktamowych z grupy penicylin z jonami metali bloku s, d i f o znaczeniu biologicznym bądź diagnostycznym. Celem pracy było określenie wpływu podstawników antybiotyków β -laktamowych z grupy penicylin na ich zdolność tworzenia związków kompleksowych z wybranymi jonami metali. W pracy zastosowano metodę potencjometryczną połączoną z komputerową analizą danych oraz metody spektroskopowe, co umożliwiło zarówno wyznaczenie parametrów równowagowych procesów kompleksowania, jak i określenie sfery koordynacyjnej atomu centralnego tworzących się kompleksów.

Reakcje kompleksowania badano potencjometrycznie w ściśle określonych warunkach. Pomiary prowadzono w układach podwójnych, stosując roztwory wodne o zróżnicowanych stosunkach molowych antybiotyków względem jonów metali. Na podstawie analizy otrzymanych danych określono skład, termodynamiczne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowagi reakcji tworzenia ($\log K_e$) dla poszczególnych form kompleksowych.

W oparciu o metody spektroskopowe potwierdzono proces kompleksowania w badanych układach oraz zidentyfikowano miejsca koordynacji jonów metali w cząsteczkach badanych antybiotyków. Analiza porównawcza otrzymanych widm umożliwiła określenie zmian zachodzących w obrębie grup funkcyjnych ligandów

uczestniczących w wiązaniu jonów metali oraz dostarczyła informacji dotyczących wewnętrznej sfery koordynacyjnej powstających kompleksów.

Uzyskane wyniki wskazują, że struktura chemiczna antybiotyków β -laktamowych z grupy penicylin, a w szczególności charakter podstawników, odgrywa istotną rolę w procesach kompleksowania z jonami metali. Przeprowadzone badania poszerzają wiedzę na temat właściwości koordynacyjnych antybiotyków β -laktamowych oraz ich związków kompleksowych.

Słowa kluczowe: związki kompleksowe, antybiotyki β -laktamowe, badania potencjometryczne, badania spektroskopowe, jony metali bloku s, d i f

Abstract

Antibiotics belong to the most important classes of drugs used in modern medicine and play a crucial role in the treatment of bacterial infections. A particularly important class comprises β -lactam antibiotics from the penicillin group, which are characterized by broad therapeutic applications and diverse chemical structures. The presence of numerous functional groups in these compounds enables their interactions with metal ions, which may, in turn, affect their physicochemical properties, stability, bioavailability, and biological activity. Understanding the complexation processes of antibiotics is essential for gaining deeper insight into the mechanisms influencing their chemical and biological properties and may also contribute to the design of new systems with potential pharmaceutical or diagnostic applications.

This doctoral dissertation presents a study of the coordination compounds formed by β -lactam antibiotics from the penicillin group with biologically or diagnostically relevant metal ions from the s-, d-, and f-block elements. The main objective of the study was to determine the influence of substituents present in β -lactam penicillin antibiotics from the penicillin group on their ability to form coordination compounds with selected metal ions. Potentiometric measurements combined with computer-assisted data analysis and spectroscopic techniques were employed to determine the equilibrium parameters of the complexation processes and the coordination environment of the central metal ion in the resulting complexes.

Complexation reactions were studied by potentiometric titration under strictly controlled experimental conditions. Measurements were performed in binary systems using aqueous solutions with various molar ratios of antibiotics to metal ions. Based on the analysis of the experimental data, the composition, thermodynamic stability constants ($\log\beta$), and equilibrium constants of the formation reactions ($\log K_e$) were determined for the individual complex species.

Spectroscopic techniques were used to confirm the complexation processes occurring in the studied systems and to identify the coordination sites of metal ions within the antibiotic molecules. Comparative analysis of the obtained spectra enabled the identification of changes occurring in the functional groups of the ligands involved in metal ion binding and provided information on the inner coordination sphere of the resulting complexes.

The obtained results indicate that the chemical structure of β -lactam penicillin antibiotics from the penicillin group, particularly the nature of their substituents, plays a significant role in their complexation with metal ions. The present study expands the current knowledge of the coordination properties of β -lactam antibiotics and their metal complexes.

Key words: complex compounds, β -lactam antibiotics, potentiometric studies, spectroscopic studies, s-, d- and f-block metal ions

Wykaz stosowanych skrótów

Amp	Ampicilina
Amox	Amoksycylina
Clox	Kloksacylina
Diclox	Dikloksacylina
MDRO	(Multi-Drug Resistant Organisms) organizmy wielolekooporne
PBP	(Penicillin Binding Proteins) białka wiążące penicylinę
NAM	Kwas N-acetylmuraminowy
NAG	N-acetyloglukozamina
6-APA	Kwas 6-aminopenicylanowy
ESBL	(extended-spectrum β -lactamases) β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania
UV-Vis	Spektroskopia absorpcyjna w zakresie ultrafioletowym i świetle widzialnym
FT-IR	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
EPR	Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego
CD	Spektroskopia dichroizmu kołowego
SEM	Siła elektromotoryczna ogniwa

1. Wprowadzenie

1.1 Historia antybiotyków

Historia antybiotyków oraz substancji wykazujących właściwości przeciwbakteryjne sięga czasów starożytnych. W starożytnym Egipcie, Grecji oraz Chinach wykorzystywano produkty naturalne, takie jak miód, wyciągi roślinne czy spleśniały chleb, które wykazywały właściwości ograniczające rozwój drobnoustrojów [1-4]. Pomimo braku wiedzy dotyczącej mikroorganizmów oraz mechanizmu działania tych substancji, obserwowano ich korzystny wpływ na proces leczenia infekcji [1,4-6].

Rozwój mikrobiologii w XIX wieku umożliwił systematyczne badania nad mikroorganizmami stanowiącymi czynnik etiologiczny chorób zakaźnych. Jednocześnie zwrócono uwagę na zjawisko antagonizmu mikrobiologicznego, przejawiające się zdolnością niektórych mikroorganizmów do hamowania wzrostu innych gatunków. Za początek nowoczesnej antybiotykoterapii uznaje się odkrycie dokonane w 1928 roku przez Alexandra Fleminga, który zaobserwował zahamowanie wzrostu bakterii *Staphylococcus* w obecności pleśni *Penicillium notatum* [1,7]. Późniejsze badania doprowadziły do wyizolowania substancji odpowiedzialnej za działanie przeciwbakteryjne, którą nazwano penicyliną [8,9].

Odkrycie właściwości przeciwbakteryjnych penicyliny nie przełożyło się początkowo na jej szerokie zastosowanie terapeutyczne, głównie z powodu trudności związanych z izolacją i oczyszczaniem tego związku [9]. Badania prowadzone w latach 40. XX wieku przez Howarda Floreya, Ernsta Borisa Chaina oraz ich współpracowników, umożliwiły opracowanie metody produkcji penicyliny na większą skalę [8]. Za wkład w odkrycie oraz rozwój zastosowania penicyliny Fleming, Florey i Chain zostali w 1945 roku uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny [10].

Odkrycie penicyliny było istotnym wydarzeniem w historii rozwoju antybiotykoterapii, które zapoczątkowało tzw. „złotą erę antybiotyków”, obejmującą głównie lata 40. i 50. XX wieku. Okres ten charakteryzował się intensywnym poszukiwaniem i identyfikacją nowych związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. W tym okresie wprowadzono do terapii między innymi streptomycynę, tetracyklinę, makrolidy oraz cefalosporyny [1,4,11-13]. Antybiotyki w znaczący sposób wpłynęły na rozwój współczesnej medycyny, przyczyniając się do

wydłużenia średniej długości życia człowieka, nawet o około 23 lata oraz zmniejszenia śmiertelności związanej z zakażeniami bakteryjnymi [14,15].

Rozwój antybiotykoterapii oraz powszechne stosowanie antybiotyków spowodowało wzrost oporności bakterii na działanie leków przeciwbakteryjnych. Zjawisko antybiooporności związane jest między innymi z produkcją enzymów rozkładających antybiotyki, takich jak β -laktamazy, modyfikacją miejsc wiązania antybiotyku, zmianą przepuszczalności błon komórkowych bakterii oraz obecnością systemów usuwających antybiotyki z komórki bakteryjnej [16-18]. Szczególnie istotnym problemem jest szybkie rozprzestrzenianie się organizmów wielolekoopornych (MDRO), które wykazują oporność na kilka grup antybiotyków jednocześnie [19,20].

Obecnie antybiooporność uznawana jest za jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego w skali globalnej [21-23]. Nadmierne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków zarówno w medycynie, weterynarii, jak i rolnictwie przyczynia się do przyspieszenia rozwoju mechanizmów oporności bakterii [23-25]. W konsekwencji obserwuje się zmniejszenie skuteczności terapii zakażeń bakteryjnych, wydłużenie czasu hospitalizacji pacjentów oraz wzrost kosztów leczenia. Dodatkowo zwiększa się ryzyko powikłań po zabiegach chirurgicznych, transplantacjach oraz terapiach wymagających osłabienia układu odpornościowego, dla których skuteczna antybiotykoterapia ma kluczowe znaczenie [21,23,25,26].

Według danych literaturowych liczba zgonów związanych z zakażeniami wywołanymi przez bakterie odporne na antybiotyki stale wzrasta [20,22,27]. Szacuje się, że w przypadku braku opracowania nowych strategii terapeutycznych oraz ograniczenia niewłaściwego stosowania antybiotyków, do 2050 roku liczba zgonów spowodowanych antybioopornością może przekroczyć 10 milionów rocznie [21,22,28]. Według prognoz, narastająca oporność bakterii na antybiotyki może generować straty ekonomiczne o skali zbliżonej do obserwowanej podczas światowych kryzysów gospodarczych [21,26,29,30].

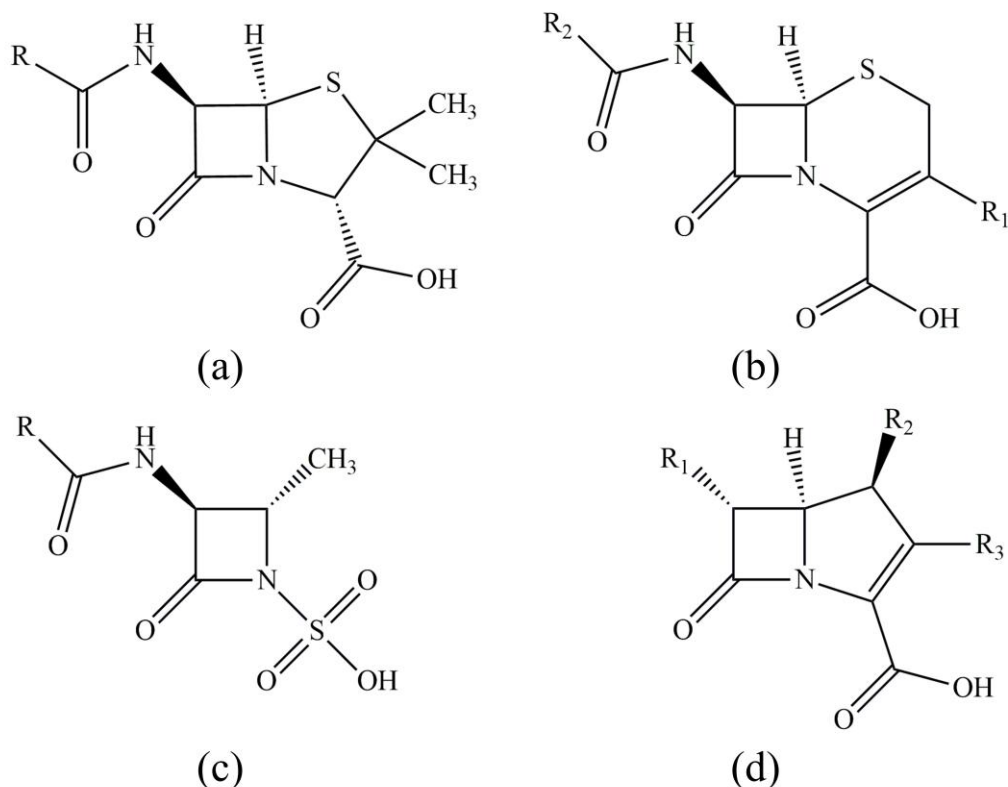
W odpowiedzi na narastający problem antybiooporności prowadzone są intensywne badania dotyczące opracowywania nowych związków przeciwbakteryjnych, modyfikacji istniejących antybiotyków oraz poszukiwania metod zwiększających efektywność ich działania [4,13,31,32]. Proces opracowywania nowych antybiotyków jest jednak długotrwały oraz wymaga przeprowadzenia wielu badań i analiz, dlatego coraz

częściej prowadzone są badania dotyczące modyfikacji już istniejących antybiotyków [31,32].

1.2 Charakterystyka antybiotyków

Antybiotyki obejmują szeroką grupę związków o zróżnicowanej budowie chemicznej i właściwościach biologicznych, wykorzystywanych w profilaktyce oraz leczeniu zakażeń bakteryjnych [33,34]. Ich aktywność wynika z selektywnego oddziaływania na określone struktury komórek bakteryjnych lub procesy metaboliczne komórek bakteryjnych, przy jednoczesnym ograniczonym wpływie na komórki organizmu gospodarza. W zależności od mechanizmu działania antybiotyki mogą hamować syntezę ściany komórkowej, biosyntezę białek, replikację kwasów nukleinowych lub zaburzać funkcjonowanie błony cytoplazmatycznej bakterii [34,35]. Ze względu na zróżnicowaną budowę chemiczną oraz odmienne mechanizmy działania antybiotyki klasyfikuje się do kilku podstawowych grup, obejmujących między innymi β -laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, tetracykliny oraz fluorochinolony. Szczególne znaczenie kliniczne w tej grupie związków mają antybiotyki β -laktamowe [30,33-35].

Antybiotyki β -laktamowe należą do najważniejszych i najczęściej stosowanych leków przeciwbakteryjnych, co wynika z ich wysokiej skuteczności terapeutycznej oraz szerokiego spektrum działania [33,36]. Charakterystyczną cechą tej grupy związków jest obecność pierścienia β -laktamowego, który jest napiętym, czteroczłonowym układem, który łatwo ulega rozerwaniu, trwale blokując enzymy, co warunkuje ich aktywność przeciwbakteryjną. Do antybiotyków β -laktamowych zalicza się między innymi penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy oraz monobaktamy (Rys. 1.) [33,36].

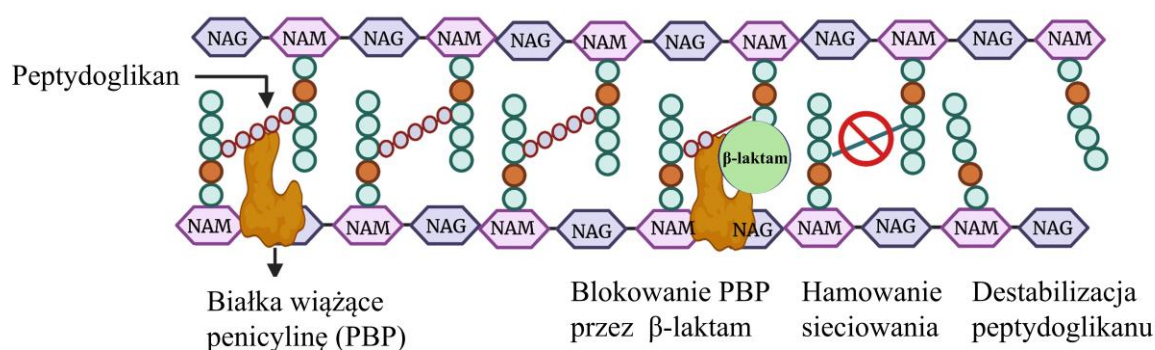


Rysunek 1. Struktura rdzenia antybiotyków β -laktamowych: (a) penicyliny, (b) cefalosporyny, (c) monobaktamy, (d) karbapenemy.

Mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych polega na hamowaniu syntezy peptydoglikanu, stanowiącego podstawowy składnik ściany komórkowej bakterii. Peptydoglikan jest polimerem zbudowanym naprzemiennie ułożonych reszt N-acetyloglukozaminy (NAG) oraz kwasu N-acetylmuraminowego (NAM), połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi [37-39]. Do reszt NAM przyłączone są krótkie łańcuchy peptydowe, pomiędzy którymi tworzone są wiązania krzyżowe odpowiadające za wytrzymałość oraz integralność ściany komórkowej bakterii. Biosynteza peptydoglikanu obejmuje reakcje transglikozylacji oraz transpeptydacji katalizowane przez białka wiążące penicylinę (PBP, *penicillin-binding proteins*) [37,39-41].

Działanie antybiotyków β -laktamowych związane jest z nieodwracalnym hamowaniem aktywności transpeptydaz należących do grupy białek PBP. Pierścień β -laktamowy wykazuje podobieństwo strukturalne do fragmentu D-Ala-D-Ala stanowiącego naturalny substrat enzymów uczestniczących w tworzeniu wiązań krzyżowych pomiędzy łańcuchami peptydowymi peptydoglikanu [36,39-44]. Wiązanie

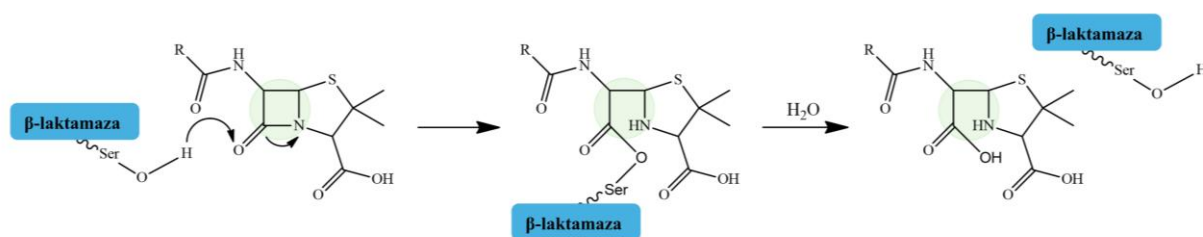
antybiotyku β -laktamowego z centrum aktywnym PBP prowadzi do nieodwracalnej inhibicji enzymu. Zahamowanie procesu transpeptydacji uniemożliwia prawidłowe usieciowanie struktur NAG-NAM, co skutkuje osłabieniem ściany komórkowej bakterii oraz utratą jej stabilności mechanicznej (Rys. 2.) [44].



Rysunek 2. Mechanizm akcji antybiotyków β -laktamowych [44].

Zaburzenia procesu biosyntezy peptydoglikanu prowadzi do utraty integralności i wytrzymałości mechanicznej ściany komórkowej bakterii. W efekcie komórka staje się bardziej podatna na działanie ciśnienia osmotycznego, co może skutkować uszkodzeniem błony cytoplazmatycznej oraz lizą komórki [45-47]. Dodatkowo zahamowanie syntezy ściany komórkowej może aktywować bakteryjne enzymy autolityczne, takie jak autolizyny, które degradują istniejący peptydoglikan i nasilają efekt bakteriobójczy antybiotyków β -laktamowych [34,36,39,45-47].

Jednym z najczęściej występujących mechanizmów oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe jest produkcja β -laktamaz, enzymów zdolnych do hydrolizy pierścienia β -laktamowego, stanowiącego kluczowy element strukturalny warunkujący aktywność przeciwbakteryjną tej grupy leków. Działanie β -laktamaz polega na rozerwaniu wiązania amidowego w obrębie pierścienia β -laktamowego, prowadząc do jego otwarcia i trwałej inaktywacji antybiotyku (Rys. 3.) [33,48-50]. W rezultacie antybiotyk traci zdolność do wiązania się z białkami PBP, a tym samym nie może hamować syntezy peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii [33].



Rysunek 3. Mechanizm hydrolizy pierścienia β -laktamowego przez β -laktamazy.

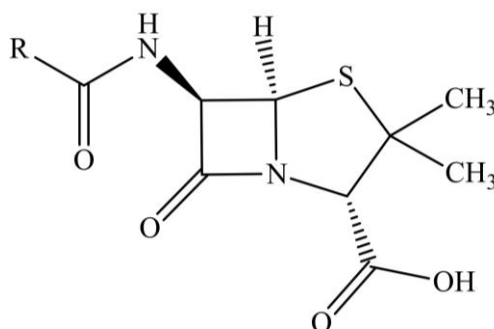
β -laktamazy są produkowane zarówno przez bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne, przy czym największe znaczenie kliniczne mają enzymy produkowane przez bakterie Gram-ujemne, które są zlokalizowane w przestrzeni peryplazmatycznej [48,49]. Enzymy te mogą być kodowane chromosomalnie lub przenoszone na plazmidach, co sprzyja szybkiemu rozprzestrzenianiu się oporności pomiędzy szczepami bakterii na drodze horyzontalnego transferu genów [51,52]. Wyróżnia się wiele typów β -laktamaz różniących się specyficznością substratową oraz zakresem hydrolizowanych antybiotyków. Szczególne zagrożenie kliniczne mają β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL, *extended-spectrum β -lactamases*), hydrolizujące penicyliny, cefalosporyny i monobaktamy, oraz karbapenemazy zdolne do inaktywacji karbapenemów, należących do grupy antybiotyków stosowanych w terapii ciężkich zakażeń wywołanych przez bakterie wielolekooporne [53-55].

W odpowiedzi na narastający problem enzymatycznej inaktywacji antybiotyków β -laktamowych opracowano inhibitory β -laktamaz, do których należą między innymi kwas klawulanowy, sulbaktam czy tazobaktam [33,49,50,56]. Związki te wykazują zdolność do nieodwracalnego wiązania z centrum aktywnym β -laktamaz, chroniąc antybiotyk przed hydrolizą i umożliwiając zachowanie jego aktywności przeciwbakteryjnej. Z tego względu inhibitory β -laktamaz są szeroko stosowane w terapii skojarzonej z penicylinami, na przykład w połączeniu amoksycyliny z kwasem klawulanowym lub piperacyliny z tazobaktamem [33,49,50,57-59].

1.3 Antybiotyki β -laktamowe z grupy penicylin

Najstarszą i jednocześnie najlepiej poznaną grupą antybiotyków β -laktamowych są penicyliny [33,36]. Pomimo opracowania wielu nowych klas leków przeciwbakteryjnych nadal należą do najczęściej stosowanych antybiotyków w terapii zakażeń bakteryjnych. Wynika to z ich wysokiej skuteczności terapeutycznej, szerokiego spektrum działania oraz stosunkowo niskiej toksyczności wobec organizmu człowieka. Penicyliny są wykorzystywane zarówno w terapii zakażeń pozaszpitalnych, jak i ciężkich zakażeń szpitalnych wywoływanych przez bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne [33,60,61].

Charakterystycznym elementem struktury penicylin jest układ złożony z czteroczłonowego pierścienia β -laktamowego połączonego z pięcioczłonowym pierścieniem tiazolidynowym. Struktury te tworzą podstawowy rdzeń cząsteczki określany mianem kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA) [33,36,62,63]. Do struktury 6-APA przyłączone są różne podstawniki boczne oznaczane symbolem R, których budowa decyduje o właściwościach biologicznych i farmakologicznych poszczególnych penicylin (Rys. 4.). Modyfikacje łańcucha bocznego wpływają między innymi na spektrum działania przeciwbakteryjnego, wrażliwość na β -laktamazy, stabilność w środowisku kwaśnym oraz parametry farmakokinetyczne tych antybiotyków [33,36,63].



Rysunek 4. Ogólny wzór strukturalny penicylin.

Połączenie pierścienia β -laktamowego z pierścieniem tiazolidynowym prowadzi do wzrostu naprężenia strukturalnego wiązania amidowego, co zwiększa reaktywność chemiczną cząsteczki. Konsekwencją tej właściwości jest wysokie powinowactwo do białek wiążących penicylinę PBP (*penicillin-binding proteins*), odpowiedzialnych za katalizowanie końcowych etapach biosyntezy peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii [36,39,64,65].

Modyfikacje chemiczne łańcucha bocznego przyłączonego do rdzenia 6-APA umożliwiły otrzymanie licznych półsyntetycznych penicylin o zróżnicowanych właściwościach farmakologicznych. Zmiany strukturalne wpływają między innymi na zakres działania przeciwbakteryjnego, odporność na hydrolizę kwasową, biodostępność po podaniu doustnym oraz wrażliwość na działanie β -laktamaz. Wprowadzenie odpowiednich podstawników umożliwiło opracowanie penicylin aktywnych wobec bakterii Gram-ujemnych, a także związków charakteryzujących się zwiększoną odpornością na działanie penicylinaz [36,49,62,66].

Zakres aktywności przeciwbakteryjnej penicylin jest ściśle związany z ich budową chemiczną. Penicyliny naturalne wykazują wysoką aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich, natomiast półsyntetyczne pochodne, takie jak aminopenicyliny, karboksypenicyliny czy ureidopenicyliny, charakteryzują się rozszerzonym zakresem działania obejmującym również wybrane bakterie Gram-ujemne. Opracowanie penicylin opornych na działanie β -laktamaz umożliwiło skuteczniejsze leczenie zakażeń wywołanych przez szczepy produkujące penicylinazy, zwłaszcza bakterie z rodzaju *Staphylococcus* [50,67,68].

Penicyliny charakteryzują się stosunkowo niską toksycznością wobec organizmu człowieka. Wynika to z ich selektywnego mechanizmu działania, ukierunkowanego na biosyntezę peptydoglikanu ściany komórkowej, struktury występującej wyłącznie u bakterii [33,34,39]. Większość penicylin jest wydalana głównie przez nerki w postaci niezmienionej. Do najczęściej obserwowanych działań niepożądanych należą reakcje nadwrażliwości obejmujące wysypki skórne, pokrzywkę oraz reakcje anafilaktyczne [69-73].

Do powszechnie stosowanych antybiotyków β -laktamowych z grupy penicylin należą między innymi penicylina G, kloksacylina, amoksycylina oraz ampicylina. Poszczególne grupy penicylin różnią się zakresem działania przeciwbakteryjnego, odpornością na β -laktamazy oraz zastosowaniem klinicznym (Tab. 1.) [33,57,73-75].

Tabela 1. Klasyfikacja antybiotyków β -laktamowych z grupy penicylin [73-75].

Klasyfikacja	Przykłady	Zastosowanie kliniczne
Penicyliny benzytowe	Benzylopenicylina Propicylina Azydocylicyna	Skuteczne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim oraz niektórym ziarenkowcom Gram-ujemnym. Penicylina G i penicylina V są stosowane w leczeniu zakażeń paciorkowcowych, kiły oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Często wybierane ze względu na skuteczność wobec określonych szczepów bakterii niewytwarzających oporności.
Penicyliny izoksazolilowe	Kloksacylina Oksacylina Nafcylicyna Metycylina	Oporne na β -laktamazy produkowane przez <i>Staphylococcus aureus</i> ; skuteczne przeciwko gronkowcom wytwarzającym penicylinazę, szczególnie stosowane w leczeniu zakażeń wywołanych przez szczepy produkujące β -laktamazy. Mają kluczowe znaczenie w leczeniu zakażeń opornych na inne antybiotyki β -laktamowe.
Aminopenicyliny	Amoksycylina Ampicylicyna Epicylicyna	Skuteczne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym; stosowane w zakażeniach dróg oddechowych, zakażeniach układu moczowego oraz bakteryjnym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych.
Karboksypenicyliny	Tikarcylina Karbenicylicyna Temocylina	O rozszerzonym spektrum działania; aktywne wobec <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i innych bakterii Gram-ujemnych. Stosowane w ciężkich zakażeniach szpitalnych oraz zakażeniach wywołanych przez <i>Pseudomonas</i> i inne bakterie Gram-ujemne odporne na aminopenicyliny.
Ureidopenicyliny	Piperacylicyna Azlocylina Mezlocylina	Penicyliny o najszerszym spektrum działania; skuteczne przeciwko <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i innym bakteriom Gram-ujemnym. Stosowane w ciężkich zakażeniach Gram-ujemnych, zakażeniach wewnętrzbrzusznych oraz sepsie; często łączone z inhibitorami β -laktamaz w celu rozszerzenia zakresu działania.

1.4 Jony metali o znaczeniu biologicznym lub diagnostycznym

Jony metali odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu organizmów żywych, uczestnicząc w wielu procesach biologicznych oraz biochemicznych [76-80]. W organizmie człowieka występują zarówno makroelementy (m.in. Ca, Na, K i Mg), niezbędne w stosunkowo dużych ilościach przekraczających 100 mg na dobę, jak i mikroelementy (m.in. Fe, Zn, Cu, Mn i Co) których dobowe zapotrzebowanie jest mniejsze niż 100 mg, jednak wykazujące istotne znaczenie fizjologiczne [79]. Jony metali uczestniczą między innymi w procesach enzymatycznych, transporcie elektronów, stabilizacji struktur biologicznych oraz regulacji procesów metabolicznych [80]. Ponadto wiele jonów metali wykorzystywanych jest w diagnostyce medycznej, terapii oraz badaniach biologicznych ze względu na ich właściwości spektroskopowe, magnetyczne lub luminescencyjne [78,81-84]. Właściwości chemiczne metali, takie jak zdolność do tworzenia związków kompleksowych, różnorodność stopni utlenienia czy właściwości magnetyczne i spektroskopowe, wpływają na ich aktywność biologiczną oraz możliwość oddziaływania z ligandami [83,85,86]. W chemii koordynacyjnej szczególne znaczenie mają jony metali należące do bloków d i f, a także – choć w nieco mniejszym stopniu – do bloku s. Jony te różnią się budową elektronową, właściwościami koordynacyjnymi oraz charakterem tworzonych kompleksów [78,83,85-87].

Metale bloku s, takie jak wapń, magnez oraz stront, pełnią przede wszystkim funkcje strukturalne i regulacyjne. Wapń jest jednym z najważniejszych makroelementów organizmu człowieka. Odpowiada za mineralizację kości i zębów, uczestniczy w procesie krzepnięcia krwi, skurczu mięśni oraz przekazywaniu sygnałów komórkowych. Jony Ca^{2+} działają również jako wtórne przekaźniki w licznych szlakach metabolicznych [88]. Zaburzenia gospodarki wapniowej mogą prowadzić do osteoporozy, tężyzki czy chorób układu sercowo-naczyniowego [89]. Ze względu na kluczową rolę jonów wapnia w procesach biologicznych są one często wykorzystywane jako modelowe jony metali w badaniach oddziaływań z ligandami o znaczeniu biologicznym [90].

Jon magnezu należy do najważniejszych kationów występujących w organizmach żywych i pełni funkcję kofaktora licznych enzymów zaangażowanych w syntezę kwasów nukleinowych, biosyntezę białek oraz przemiany energetyczne związane z ATP [91,92]. Jony Mg(II) uczestniczą również w stabilizacji struktury DNA i RNA oraz odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego i mięśniowego. Niedobór magnezu może prowadzić do zaburzeń rytmu serca, osłabienia mięśni czy

zwiększonej pobudliwości nerwowej [91,93]. Ze względu na duże znaczenie biologiczne magnez jest często uwzględniany w badaniach kompleksowania związków biologicznie aktywnych [90].

Jony strontu ze względu na podobieństwo właściwości chemicznych do jonów wapnia mogą być wbudowywane w strukturę tkanki kostnej zamiast Ca^{2+} [94]. Związki strontu znalazły zastosowanie w leczeniu osteoporozy, ponieważ wpływają zarówno na hamowanie resorpcji kości, jak i stymulację procesów kościotwórczych [95]. Szczególne znaczenie diagnostyczne posiada radioizotop ^{89}Sr wykorzystywany w terapii paliatywnej w leczeniu bólu związanego z przerzutami nowotworowymi do kości [96].

Metale bloku d charakteryzują się obecnością częściowo zapełnionych orbitali d, co wpływa na ich zdolność do tworzenia trwałych związków koordynacyjnych o zróżnicowanej geometrii oraz właściwościach magnetycznych i spektroskopowych [83]. Do najważniejszych biologicznie jonów tej grupy należą między innymi jony miedzi, kobaltu oraz niklu. Miedź jest mikroelementem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu i stanowi składnik wielu enzymów oksydoredukcyjnych, takich jak oksydaza cytochromowa czy dysmutaza ponadtlenkowa [97,98]. Jony Cu^{2+} uczestniczą w procesach oddychania komórkowego, metabolizmie żelaza oraz neutralizacji reaktywnych form tlenu [99]. Obecność niesparowanego elektronu sprawia, że kompleksy Cu(II) wykazują właściwości paramagnetyczne i mogą być analizowane metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [100].

Znaczenie biologiczne wykazuje także jon kobaltu Co^{2+} , będący składnikiem witaminy B_{12} [101]. Pierwiastek ten uczestniczy w wielu w procesach metabolicznych, w tym syntezie kwasów nukleinowych oraz procesach hematopoezy [102]. Z punktu widzenia chemii koordynacyjnej jony Co(II) tworzą liczne związki kompleksowe o zróżnicowanej geometrii i właściwościach magnetycznych [83]. Szczególne znaczenie diagnostyczne posiada również radioizotop ^{60}Co , wykorzystywany w radioterapii nowotworów [103].

Nikiel należy do pierwiastków śladowych występujących w niewielkich ilościach w organizmach żywych. W układach biologicznych jon Ni^{2+} jest przede wszystkim składnikiem enzymów występujących u mikroorganizmów, takich jak ureaza, hydrogenaza czy reduktaza tlenku węgla, gdzie uczestniczy w przemianach metabolicznych związanych między innymi z metabolizmem azotu i wodoru [104,105]. Zdolność jonów niklu do

tworzenia trwałych kompleksów z ligandami biologicznymi odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu tych układów enzymatycznych. Jednocześnie nadmierna ekspozycja na związki niklu może prowadzić do występowania efektów toksycznych oraz reakcji alergicznych [106].

Istotną grupę metali wykorzystywanych w diagnostyce i analizie biologicznej stanowią pierwiastki bloku f, przede wszystkim lantanowce. Ich charakterystyczne właściwości wynikają z obecności elektronów na orbitalach 4f, które odpowiadają za specyficzne cechy magnetyczne oraz luminescencyjne tych jonów [82,84]. Jony lantanowców tworzą związki kompleksowe o wysokich liczbach koordynacyjnych, wykazując jednocześnie preferencję do koordynacji ligandów zawierających donorowe atomy tlenu [85,107]. Ze względu na charakterystyczne właściwości emisyjne i magnetyczne kompleksy lantanowców znajdują szerokie zastosowanie w diagnostyce medycznej oraz materiałach optycznych [82,107]. Szczególnie interesującym przedstawicielem tej grupy jest europ, który wykazuje silne właściwości luminescencyjne [82,108]. Dzięki dużej intensywności emisji oraz długiemu czasowi życia luminescencji, kompleksy europu znalazły zastosowanie jako znaczniki fluorescencyjne w testach immunochemicznych oraz technikach obrazowania biomedycznego [84,109].

Terb, podobnie jak europ, znajduje zastosowanie w technikach wykorzystujących zjawisko luminescencji. Kompleksy jonów Tb(III) charakteryzują się intensywną emisją zielonego światła oraz wysoką stabilnością fotochemiczną [82,84]. Właściwości te sprawiają, że są one wykorzystywane w biosensorach, testach diagnostycznych oraz badaniach oddziaływań biomolekuł [109-111]. Szczególne znaczenie mają układy opierające się na transferze energii pomiędzy ligandem a jonem metalu, które umożliwiają uzyskanie sygnałów luminescencyjnych o wysokiej intensywności i tym samym zwiększenie czułości metod detekcyjnych [84,110,112].

Neodym jest przedstawicielem lantanowców charakteryzujących się właściwościami paramagnetycznymi oraz optycznymi [82,85]. Pomimo ograniczonego znaczenia biologicznego w porównaniu z jonami metali niezbędnych do funkcjonowania organizmów żywych, takimi jak wapnia czy magnezu, jony neodymu są wykorzystywane w badaniach spektroskopowych oraz w projektowaniu materiałów funkcjonalnych stosowanych w diagnostyce i technikach obrazowania [82,113]. Zdolność lantanowców do tworzenia

trwałych kompleksów z ligandami biologicznie aktywnymi sprawia, że są one cennymi modelami w badaniach chemii biokoordynacyjnej [114,115].

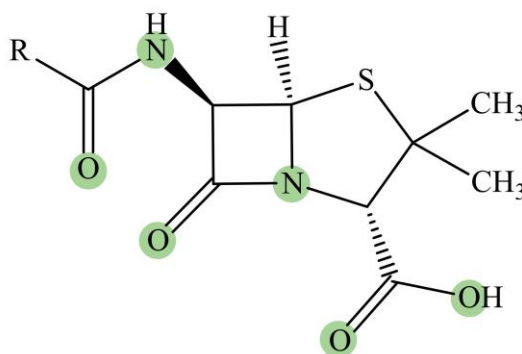
Opisane jony metali różnią się właściwościami chemicznymi, biologicznymi i diagnostycznymi, jednak wszystkie odgrywają istotną rolę w nowoczesnej chemii bionieorganicznej oraz chemii medycznej.

1.5 Związki kompleksowe antybiotyków

Pomimo wieloletniego stosowania antybiotyków β -laktamowych oraz szczegółowego poznania ich właściwości farmakologicznych, zagadnienie połączeń tych związków z jonami metali pozostaje stosunkowo słabo poznany obszarem chemii koordynacyjnej i bionieorganicznej [83,116-129]. Dotychczasowe badania dotyczące antybiotyków β -laktamowych koncentrowały się głównie na mechanizmie ich działania, zjawisku lekooporności drobnoustrojów oraz modyfikacjach strukturalnych prowadzących do opracowania nowych generacji leków [33,68,50]. Znacznie mniej uwagi poświęcono natomiast ich zdolności do tworzenia związków kompleksowych z jonami metali. Tymczasem obecność jonów metali może w istotny sposób wpływać na właściwości fizykochemiczne i biologiczne antybiotyków, w tym ich rozpuszczalność, stabilność, biodostępność czy aktywność przeciwdrobnoustrojową [83,117-119]. Z tego względu poznanie połączenia pomiędzy antybiotykami β -laktamowymi a jonami metali ma istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne.

Dotychczasowe badania wykazały, że antybiotyki β -laktamowe mogą tworzyć związki kompleksowe z szeroką grupą jonów metali obejmującą zarówno pierwiastki bloku s, d jak i f [116,120-135]. Właściwości powstających układów zależą od budowy chemicznej liganda, rodzaju jonu metalu oraz warunków środowiska, takich jak pH, temperatura czy siła jonowa roztworu [122,125-129]. W ostatnich latach obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania tą tematyką, czego odzwierciedleniem jest rosnąca liczba publikacji poświęconych strukturze, właściwościom koordynacyjnym oraz aktywności biologicznej kompleksów antybiotyków β -laktamowych [116].

Zdolność antybiotyków β -laktamowych do tworzenia kompleksów z jonami metali wynika z obecności grup funkcyjnych zawierających centra donorowe zdolne do tworzenia wiązań koordynacyjnych [116,120]. Szczególnie istotną rolę odgrywa grupa karboksylowa, która po deprotonacji staje się silnym donorem elektronów i może uczestniczyć w koordynacji zarówno jonów metali przejściowych, jak i metali ziem alkalicznych oraz lantanowców [122,126,127]. W zależności od budowy chemicznej antybiotyku w procesie koordynacji mogą uczestniczyć również atomy tlenu grup karbonylowych, atomy azotu grup aminowych czy heteroatomy obecne w pierścieniach heterocyklicznych [116,124]. Jak przedstawiono na rysunku 5, w strukturze penicylin występuje kilka potencjalnych centrów koordynacyjnych zdolnych do wiązania jonów metali. Ostateczny sposób koordynacji zależy od właściwości jonu metalu, wartości pH oraz budowy przestrzennej liganda.



Rysunek 5. Ogólny wzór strukturalny antybiotyków β -laktamowych wraz z zaznaczeniem potencjalnych miejsc koordynacji i atomów donorowych uczestniczących w tworzeniu wiązań koordynacyjnych z jonami metali.

Istotną cechą antybiotyków β -laktamowych jest obecność pierścienia β -laktamowego, odpowiedzialnego za ich aktywność biologiczną [33,83,134]. Mimo, że atom tlenu grupy karbonylowej tego pierścienia może uczestniczyć w procesie koordynacji jonów metali, jego udział jest zazwyczaj ograniczony ze względu na specyficzne właściwości elektronowe oraz naprężenie strukturalne układu β -laktamowego [116,120]. W konsekwencji w większości opisanych w literaturze przypadków dominującym centrum koordynacyjnym pozostaje grupa karboksylowa, wykazująca największe powinowactwo do jonów metali.

Pierwsze doniesienia dotyczące związków kompleksowych antybiotyków β -laktamowych pojawiły się w latach siedemdziesiątych XX wieku [116,120]. Początkowo badania koncentrowały się głównie na syntezie oraz podstawowej charakterystyce izolowanych kompleksów metali przejściowych z wybranymi przedstawicielami penicylin i cefalosporyn [116,119-135]. W kolejnych latach rozwój metod spektroskopowych oraz technik potencjometrycznych umożliwił bardziej szczegółowe badanie procesów kompleksowania zachodzących w roztworach wodnych. Pozwoliło to na wyznaczenie parametrów równowagowych, określanie składu powstających form kompleksowych oraz identyfikację atomów donorowych uczestniczących w procesie koordynacji. Dzięki temu możliwe stało się znacznie dokładniejsze poznanie mechanizmów oddziaływań pomiędzy antybiotykami β -laktamowymi a jonami metali.

Największą liczbę badań poświęcono aminopenicylinom, przede wszystkim ampicylinie i amoksycylinie, które należą do najlepiej poznanych antybiotyków β -laktamowych pod względem właściwości koordynacyjnych. Wykazano, że związki te tworzą trwałe kompleksy z jonami metali, między innymi Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II), Mn(II) oraz Fe(III) [121-129]. Otrzymane wyniki wskazują, że trwałość powstających układów jest determinowana zarówno właściwościami fizykochemicznymi jonu metalu, jak i budową chemiczną liganda, w szczególności liczbą oraz dostępnością centrów donorowych w cząsteczce antybiotyku.

Spośród badanych jonów metali szczególne zainteresowanie wzbudzają kompleksy miedzi(II) [121,124,130]. Jony Cu(II) wykazują wysokie powinowactwo do donorowych atomów tlenu i azotu, co sprzyja tworzeniu trwałych układów kompleksowych z antybiotykami β -laktamowymi. W wielu przypadkach obserwowano powstawanie struktur chelatowych, w których jon metalu jest koordynowany jednocześnie przez grupę karboksylową oraz dodatkowe atomy donorowe obecne w cząsteczce liganda.

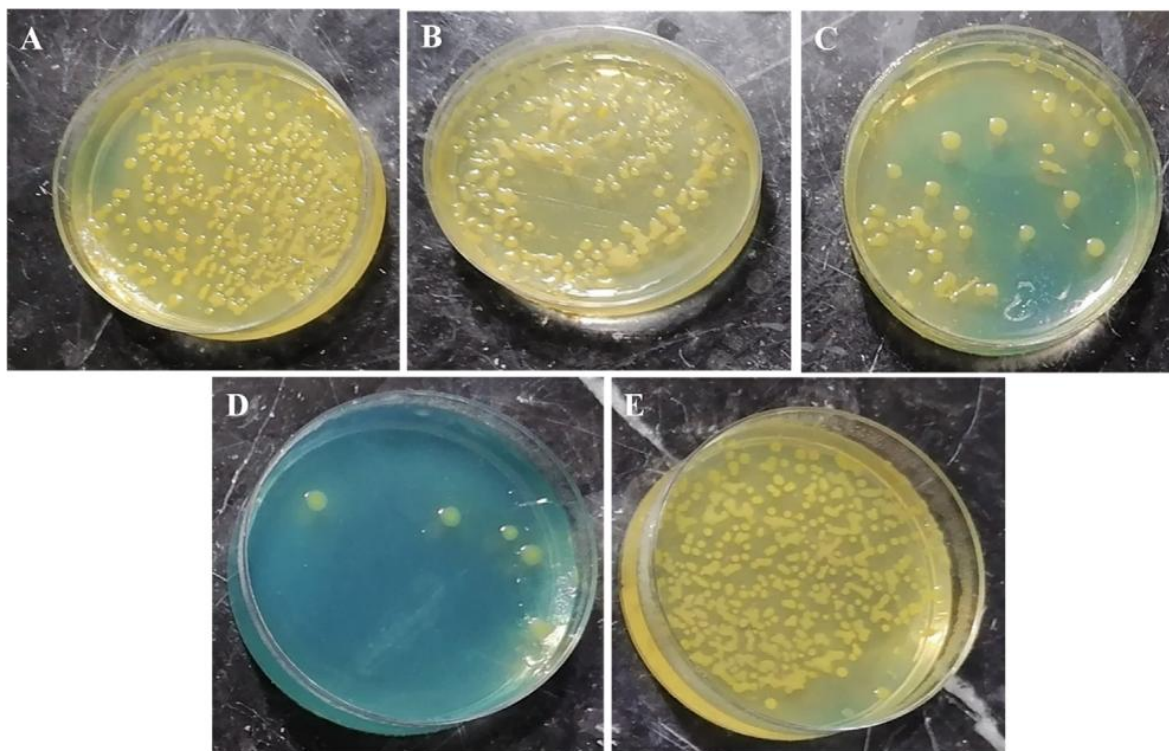
Stosunkowo dobrze poznane są również kompleksy cynku(II) [127,135]. Zainteresowanie tymi kompleksami wynika z istotnej roli biologicznej cynku, który jest składnikiem wielu enzymów oraz białek regulatorowych uczestniczących w podstawowych procesach metabolicznych. Wykazano, że kompleksowanie antybiotyków β -laktamowych z jonami Zn(II) może wpływać na ich stabilność chemiczną oraz właściwości biologiczne.

Badania prowadzone z udziałem jonów niklu(II), kobaltu(II) oraz manganu(II) wykazały podobny charakter oddziaływań z antybiotykami β -laktamowymi, chociaż trwałość tworzonych kompleksów była zazwyczaj mniejsza niż w przypadku analogicznych układów zawierających jony miedzi(II) [122,131]. Dla wielu badanych ligandów obserwowano zależność zgodną z szeregiem Irvinga-Williamsa, opisującym względną trwałość kompleksów metali przejściowych pierwszego szeregu.

Istotne miejsce wśród badań nad kompleksami antybiotyków β -laktamowych zajmują również cefalosporyny [120,130-135]. W porównaniu z penicylinami związki te charakteryzują się bardziej złożoną budową chemiczną oraz większą liczbą potencjalnych centrów koordynacyjnych, co sprzyja tworzeniu układów kompleksowych o zróżnicowanej strukturze. W literaturze opisano między innymi kompleksy cefaleksyny, cefadroksylu, ceftriaksonu oraz cefotaksymu z licznymi jonami metali przejściowych, wykazując możliwość tworzenia struktur o różnej geometrii i stechiometrii.

Znacznie mniej danych literaturowych dostępnych jest dla kompleksów antybiotyków β -laktamowych z jonami lantanowców [116,125,128]. Dotychczasowe badania wskazują jednak, że jony te są zdolne do tworzenia trwałych związków kompleksowych, w których główną rolę w procesie koordynacji odgrywają grupy karboksylowe ligandów. Właściwości powstających układów zależą między innymi od promienia jonowego metalu liczby koordynacyjnej oraz stopnia hydratacji jonu. W wielu przypadkach obserwowane zależności odzwierciedlają tendencje charakterystyczne dla szeregu lantanowców.

Szczególne zainteresowanie badaczy budzi wpływ kompleksowania na aktywność biologiczną antybiotyków [116-121,132,134]. Liczne doniesienia wskazują, że tworzenie kompleksów z jonami metali może prowadzić do modyfikacji właściwości przeciwdrobnoustrojowych antybiotyków. Przykładowo kompleksy amoksycyliny z jonami Fe(III) oraz Cu(II) wykazywały większą aktywność wobec *Escherichia coli* niż wolny antybiotyk [121] (Rys. 6.). Podobne zależności zaobserwowano dla kompleksów cefalosporyn z jonami Cu(II) oraz Zn(II), które charakteryzowały się zwiększoną skutecznością wobec wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [132,133,135]. Mechanizm tego zjawiska nie został jednak jednoznacznie wyjaśniony. Zakłada się jednak, że kompleksowanie może prowadzić do zwiększenia lipofilowości układu, ułatwiając jego transport przez błony komórkowe bakterii, a także częściowo chronić pierścień β -laktamowy przed hydrolizą enzymatyczną. W konsekwencji obserwowane są również zmiany aktywności przeciwdrobnoustrojowej. W wielu przypadkach kompleksy wykazują większą skuteczność wobec bakterii niż wolny ligand, co tłumaczy się między innymi łatwiejszym transportem przez błony komórkowe oraz możliwością synergistycznego działania jonu metalu i antybiotyku.



Rysunek 6. Porównanie aktywności przeciwbakteryjnej wobec *Escherichia coli*: (a) próbki kontrolnej, (b) amoksycyliny, (c) kompleksu miedzi(II) z amoksycyliną, (d) kompleksu żelaza(III) z amoksycyliną, (e) kompleksu cynku z amoksycyliną po 24h inkubacji [121].

Dotychczasowe badania jednoznacznie potwierdzają zdolność antybiotyków β -laktamowych do tworzenia związków kompleksowych z licznymi jonami metali należącymi do bloków s, d oraz f. Wykazano, że proces kompleksowania może istotnie wpływać na właściwości fizykochemiczne ligandów, ich trwałość oraz aktywność biologiczną. Charakter tych oddziaływań jest determinowany zarówno przez budowę antybiotyku, jak i właściwości jonu metalu, co sprawia, że kompleksy antybiotyków β -laktamowych stanowią interesujący i perspektywiczny obiekt badań z zakresu chemii koordynacyjnej i bionieorganicznej [116-120].

Pomimo rosnącego zainteresowania tematyką kompleksów antybiotyków β -laktamowych liczba dostępnych opracowań tego zagadnienia nadal pozostaje stosunkowo ograniczona. Przez wiele lat publikowane prace koncentrowały się przede wszystkim na syntezie pojedynczych związków kompleksowych oraz podstawowej charakterystyce ich właściwości strukturalnych i biologicznych. Dopiero w ostatnich latach zaczęły pojawiać się bardziej kompleksowe opracowania podsumowujące dotychczasowy stan wiedzy dotyczący

oddziaływań antybiotyków β -laktamowych z jonami metali oraz mechanizmów ich kompleksowania [116,120-135].

Wiele zagadnień dotyczących właściwości koordynacyjnych kompleksów antybiotyków β -laktamowych pozostaje nadal niewyjaśnionych. W szczególności dotyczy to zależności pomiędzy budową chemiczną ligandów a trwałością termodynamiczną tworzonych kompleksów, wpływu rodzaju jonu metalu na skład i przebieg procesów kompleksowania oraz czynników determinujących stabilność poszczególnych form kompleksowych. Szczególnie znaczenie mają badania prowadzone w roztworach wodnych, umożliwiające określenie parametrów równowagowych oraz identyfikację form kompleksowych występujących w warunkach zbliżonych do środowiska biologicznego [116,118,120].

W związku z tym związki kompleksowe antybiotyków β -laktamowych pozostają interesującym obiektem badań podstawowych, umożliwiającymi lepsze poznanie zależności pomiędzy budową chemiczną ligandów, właściwościami jonów metali oraz przebiegiem procesów kompleksowania. Poszerzanie wiedzy w tym zakresie ma istotne znaczenie dla rozwoju chemii koordynacyjnej związków biologicznie aktywnych oraz lepszego zrozumienia oddziaływań zachodzących pomiędzy lekami a jonami metali.

2. Metody badawcze

2.1 Miareczkowanie potencjometryczne

Miareczkowanie potencjometryczne jest jedną z podstawowych metod wykorzystywanych w badaniach równowag kwasowo-zasadowych oraz procesów kompleksowania zachodzących w roztworach wodnych. Technika ta umożliwia wyznaczenie stałych protonowania ligandów, składu tworzących się form kompleksowych oraz określenie ich ogólnych stałych trwałości [136,137]. Dzięki wysokiej dokładności oraz możliwości analizy złożonych układów wieloskładnikowych metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w chemii koordynacyjnej, chemii analitycznej, a także w monitorowaniu środowiska czy badaniach laboratoryjnych przez precyzyjne oznaczanie stężenia jonów.

Potencjometria jest metodą elektroanalityczną polegającą na pomiarze siły elektromotorycznej ogniwa (SEM) powstającej pomiędzy elektrodą wskaźnikową a elektrodą odniesienia podczas stopniowego dodawania titranta do badanego roztworu [138]. Wartość mierzonej SEM zależy od aktywności jonów obecnych w roztworze, a w przypadku badań kwasowo-zasadowych oraz procesów kompleksowania najczęściej związana jest ze zmianami stężenia jonów wodorowych. Do pomiarów wykorzystywana jest najczęściej kombinowana elektroda szklana połączona z elektrodą odniesienia, umożliwiającą rejestrowanie zmian pH zachodzących podczas miareczkowania [138]. Zależność pomiędzy potencjałem elektrody a aktywnością jonów wodorowych opisuje równanie Nernsta:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln a_{H^+}$$

gdzie:

E – potencjał elektrody,

E^0 – potencjał standardowy elektrody,

R – stała gazowa,

T – temperatura,

n – liczba wymienianych elektronów,

F – stała Faradaya,

a_{H^+} – aktywność jonów wodorowych.

Podczas miareczkowania do badanego roztworu stopniowo dodawane są niewielkie objętości titranta, najczęściej roztworu mocnej zasady lub kwasu o ściśle określonym stężeniu. Dodatek titranta powoduje przesunięcie równowagi chemicznej w układzie, co prowadzi do zmiany aktywności jonów wodorowych oraz zmiany wartości SEM. Po ustabilizowaniu potencjału rejestrowana jest jego wartość dla danego punktu miareczkowania, a następnie dodawana jest kolejna porcja titranta. Proces ten jest kontynuowany do uzyskania wymaganego zakresu pH. Zarejestrowane wartości potencjału przeliczane są następnie na odpowiadające im wartości pH i wykorzystywane są do sporządzania krzywych miareczkowania [137].

W badaniach układów kompleksowych obserwowane zmiany pH są związane między innymi z procesami protonowania i deprotonowania ligandów oraz tworzeniem form kompleksowych z jonami metali [136]. Koordynacja ligandu do jonu metalu często prowadzi do uwolnienia protonów do roztworu, co wpływa na przebieg krzywej miareczkowania w porównaniu do układów zawierających wyłącznie wolny ligand. Analiza uzyskanych krzywych umożliwia określenie liczby protonów uczestniczących w reakcjach równowagowych, określenie stechiometrii powstających form kompleksowych oraz wyznaczenie parametrów termodynamicznych opisujących proces kompleksowania.

Dokładność wyników uzyskanych metodą potencjometryczną zależy od wielu czynników, takich jak stabilność elektrody, dokładność dozowania titranta, temperatura pomiaru oraz utrzymanie stałej siły jonowej roztworu. W celu ograniczenia wpływu zmian aktywności jonów wynikających z wahań siły jonowej powszechnie stosuje się dodatki elektrolitów obojętnych, takich jak azotan(V) potasu lub chlorek potasu. Istotnym etapem procedury pomiarowej jest również kalibracja elektrody szklanej, która umożliwia prawidłowe wyznaczenie wartości pH oraz zwiększa dokładność wyznaczanych stałych równowagowych [138].

W celu wyznaczenia parametrów równowagowych otrzymane dane potencjometryczne poddawane są analizie komputerowej. Jednym z najczęściej wykorzystywanych programów do opracowywania wyników badań potencjometrycznych jest program HYPERQUAD [136]. Umożliwia on analizę układów wieloskładnikowych oraz wyznaczanie ogólnych stałych trwałości tworzących się form kompleksowych na podstawie dopasowania modelu równowagowego do danych eksperymentalnych. Obliczenia wykonywane są metodą nieliniowej regresji najmniejszych kwadratów, co

pozwała na uzyskanie najbardziej prawdopodobnych wartości stałych równowagowych opisujących badany układ.

Program HYPERQUAD umożliwia określenie składu stechiometrycznego tworzonych form kompleksowych oraz analizę rozkładu form występujących w roztworze w zależności od pH. Na podstawie otrzymanych wyników możliwe jest wyznaczenie zakresów dominacji poszczególnych form kompleksowych oraz określenie wpływu warunków środowiska na przebieg procesu kompleksowania [136]. Możliwość jednoczesnego modelowania wielu współistniejących równowag chemicznych sprawia, że program ten jest powszechnie wykorzystywany w badaniach chemii koordynacyjnej, chemii bionieorganicznej oraz układów zawierających związki biologicznie aktywne [136,139].

Miareczkowanie potencjometryczne, w połączeniu z analizą komputerową danych, stanowi obecnie jedną z podstawowych metod stosowanych w badaniach procesów kompleksowania zachodzących w roztworach wodnych [136]. Wysoka precyzja pomiarów oraz możliwość zaawansowanego opracowania danych pozwalają na szczegółową charakterystykę właściwości równowagowych badanych układów chemicznych. Uzyskane wyniki są często uzupełniane badaniami spektroskopowymi, które umożliwiają potwierdzenie tworzenia związków kompleksowych oraz określenie sposobu koordynacji ligandów do jonu metalu.

2.2 Techniki spektroskopowe stosowane w badaniach związków kompleksowych

Techniki spektroskopowe odgrywają istotną rolę w badaniach związków kompleksowych oraz analizie oddziaływań zachodzących pomiędzy ligandami a jonami metali. Metody te umożliwiają uzyskanie informacji dotyczących struktury badanych układów, identyfikację grup funkcyjnych uczestniczących w procesie koordynacji, określenie geometrii kompleksów oraz ocenę zmian właściwości elektronowych i konformacyjnych zachodzących podczas tworzenia związków kompleksowych [83]. Ich istotną zaletą jest wysoka czułość, możliwość analizy układów o niewielkich stężeniach oraz prowadzenia pomiarów zarówno w fazie stałej, jak i w roztworach. Dzięki temu techniki spektroskopowe znajdują szerokie zastosowanie w chemii koordynacyjnej, analitycznej oraz bionieorganicznej. W badaniach układów biologicznie aktywnych

umożliwiają one również monitorowanie zmian zachodzących w środowisku koordynacyjnym jonu metalu oraz ocenę wpływu procesu kompleksowania na właściwości fizykochemiczne ligandów [83].

Jedną z najczęściej stosowanych metod spektroskopowych jest spektroskopia UV-Vis, opierająca się na absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie ultrafioletu oraz światła widzialnego. Oddziaływanie promieniowania z badaną substancją prowadzi do wzbudzenia elektronów i przejść pomiędzy poziomami energetycznymi cząsteczki. W przypadku związków kompleksowych obserwowane mogą być między innymi przejścia typu $d - d$, przejścia związane z przeniesieniem ładunku (*charge transfer*) oraz przejścia charakterystyczne dla grup chromoforowych ligandów. Analiza położenia maksimum absorpcji, intensywności pasm oraz zmian wartości absorbancji umożliwia identyfikację procesów kompleksowania oraz ocenę wpływu jonów metali na strukturę elektronową ligandów [140].

W badaniach związków kompleksowych szerokie zastosowanie znajduje również spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR, ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Metoda ta opiera się na absorpcji promieniowania podczerwonego, prowadzącej do wzbudzenia drgań wiązań chemicznych obecnych w cząsteczce. Poszczególne grupy funkcyjne absorbują promieniowanie w charakterystycznych zakresach liczby falowej, co umożliwia identyfikację określonych fragmentów struktury chemicznej. Analiza widm FT-IR dostarcza informacji na temat udziału atomów donorowych w procesie koordynacji do jonu metalu oraz ocenę zmian zachodzących w obrębie wiązań chemicznych podczas tworzenia związków kompleksowych. W przypadku antybiotyków β -laktamowych szczególne znaczenie mają pasma odpowiadające drganiom grup karbonylowych, karboksylowych oraz aminowych. Przesunięcia pasm absorpcyjnych, zmiany ich intensywności lub pojawienie się nowych sygnałów mogą świadczyć o udziale określonych grup funkcyjnych w procesie koordynacji oraz o modyfikacjach zachodzących w strukturze wewnętrznej sfery koordynacyjnej kompleksu [141].

Istotnym narzędziem wykorzystywanym w badaniach związków kompleksowych zawierających jony metali o właściwościach emisyjnych jest spektroskopia luminescencyjna. Zjawisko luminescencji polega na emisji promieniowania przez wzbudzoną cząsteczkę lub jon po wcześniejszej absorpcji energii. W przypadku związków kompleksowych metoda ta umożliwia analizę zmian zachodzących w otoczeniu jonu

centralnego oraz ocenę wpływu ligandów na właściwości emisyjne układu. Szczególne znaczenie ma ona w badaniach kompleksów jonów lantanowców, takich jak europ(III) czy terb(III), które wykazują charakterystyczne pasma emisyjne, długie czasy życia stanów wzbudzonych oraz wysoką czułość na zmiany środowiska koordynacyjnego. Analiza widm emisji pozwala między innymi na określenie stopnia hydratacji kompleksów oraz ocenę efektywności przekazywania energii pomiędzy ligandem a jonem metalu [84,85].

Do badań związków kompleksowych zawierających jony metali posiadające niesparowane elektrony stosowana jest spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR, ang. *Electron Paramagnetic Resonance*). Metoda ta opiera się na absorpcji promieniowania mikrofalowego przez układy paramagnetyczne znajdujące się w polu magnetycznym. Technika EPR umożliwia analizę właściwości magnetycznych badanych układów oraz dostarcza informacji dotyczących struktury elektronowej jonu metalu, charakteru oddziaływań pomiędzy jonem centralnym a ligandami oraz geometrii kompleksu [100,142]. Szczególne zastosowanie znajduje ona w badaniach kompleksów jonów metali przejściowych, takich jak Cu(II), Fe(III) czy Mn(II) [100].

Związki chiralne oraz układy wykazujące aktywność optyczną można badać wykorzystując spektroskopię dichroizmu kołowego (CD, ang. *Circular Dichroism*). Metoda ta polega na pomiarze różnicy absorpcji lewo- i prawoskrętnie spolaryzowanego światła przez cząsteczki chiralne. Analiza widm CD umożliwia określenie zmian konformacyjnych cząsteczek oraz ocenę wpływu procesu kompleksowania na strukturę przestrzenną ligandów [143]. Technika ta znajduje zastosowanie szczególnie w badaniach biologicznie aktywnych ligandów zawierających asymetryczne atomy węgla lub wykazujących aktywność optyczną. W przypadku układów kompleksowych analiza widm CD dostarcza informacji na temat zmian organizacji przestrzennej ligandów oraz wpływu koordynacji do jonu metalu na właściwości stereochemiczne [143,144].

Zastosowanie różnych technik spektroskopowych umożliwia uzyskanie komplementarnych informacji dotyczących struktury oraz właściwości badanych układów kompleksowych. Połączenie badań potencjometrycznych z metodami spektroskopowymi pozwala na dokładniejsze określenie składu, trwałości oraz sposobu koordynacji ligandów do jonów metali, co ma istotne znaczenie w badaniach związków biologicznie aktywnych oraz układów modelowych chemii koordynacyjnej.

3. Cel pracy

Celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu podstawników na trwałość termodynamiczną oraz właściwości spektroskopowe antybiotyków β -laktamowych z grupy penicylin i ich związków kompleksowych z wybranymi jonami metali s-, d- i f-elektronowymi.

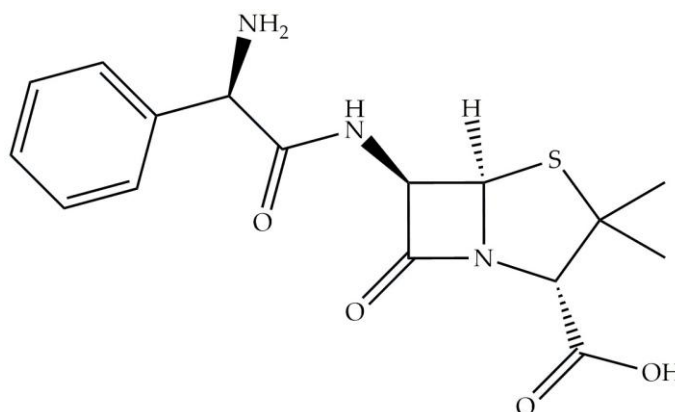
Przeprowadzone badania obejmowały charakterystykę związków kompleksowych powstających w układach podwójnych antybiotyków β -laktamowych z jonami metali (Mg(II), Ca(II), Sr(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Nd(III), Eu(III), Tb(III)). W ramach pracy przeprowadzono pomiary potencjometryczne, na podstawie których określono skład i trwałość otrzymanych kompleksów oraz sposób koordynacji jonów metali. Otrzymane związki kompleksowe scharakteryzowano z wykorzystaniem metod spektroskopowych, co umożliwiło określenie miejsc koordynacji oraz zmian zachodzących w strukturze ligandów podczas procesu kompleksowania. Pełna charakterystyka kompleksów pozwoliła na określenie ich właściwości wynikających bezpośrednio z budowy wewnętrznej sfery koordynacyjnej oraz na przeprowadzenie analizy porównawczej względem nieskompleksowanych ligandów. Ponadto przeprowadzono analizę zależności pomiędzy budową ligandów a właściwościami fizykochemicznymi.

4. Omówienie wyników

4.1 Związki kompleksowe ampicyliny (A1) – Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies

Pierwsza publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej poświęcona była badaniom procesu kompleksowania ampicyliny z jonami metali reprezentującymi bloki s, d i f układu okresowego pierwiastków. Zakres badań obejmował jony Mg(II), Ca(II), Sr(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Nd(III), Eu(III), Tb(III).

Ampicylina (Amp) (Rys. 7.) należy do grupy półsyntetycznych antybiotyków β -laktamowych zaliczanych do aminopenicylin. Dzięki szerokiemu spektrum działania przeciwbakteryjnego od wielu lat znajduje szerokie zastosowanie w leczeniu zakażeń wywołanych zarówno przez bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. W praktyce klinicznej wykorzystywana jest między innymi w terapii zakażeń układu oddechowego, układu moczowego, przewodu pokarmowego oraz zakażeń skóry i tkanek miękkich.



Rysunek 7. Wzór ampicyliny.

Podstawową techniką zastosowaną w badaniach było miareczkowanie potencjometryczne prowadzone w roztworach wodnych w zakresie pH 2,5-11,0. Pomiary wykonywano przy zachowaniu stałej temperatury (20°C) oraz stałej siły jonowej roztworów (KNO₃, c=0,1 M), co zapewniło możliwość wyznaczenia parametrów równowagowych. Uzyskane dane potencjometryczne posłużyły do określenia stałych protonacji ampicyliny oraz identyfikacji form kompleksowych powstających w badanych układach. Analiza uzyskanych danych umożliwiła identyfikację dominujących form kompleksowych, określenie zakresów dominacji poszczególnych form kompleksowych oraz ocenę wpływu odczynu roztworu na przebieg procesów kompleksowania.

Analizę danych potencjometrycznych przeprowadzono z wykorzystaniem programu HYPERQUAD, stosowanego do modelowania równowag chemicznych w roztworach wieloskładnikowych. Oprogramowanie to umożliwiło wyznaczenie ogólnych wartości stałych trwałości form kompleksowych, stałych równowagi reakcji tworzenia się powstających kompleksów. Na podstawie uzyskanych parametrów obliczono udziały molowe poszczególnych form występujących w roztworze i sporządzono krzywe dystrybucji przedstawiające zmiany ich udziału w funkcji pH. Analiza rozkładu form umożliwiła określenie zakresów dominacji poszczególnych kompleksów oraz ocenę wpływu odczynu roztworu na przebieg procesów kompleksowania.

Pierwszym etapem badań było wyznaczenie stałych protonacji dla ampicyliny. Otrzymane wartości ogólnych stałych protonowania wynosiły $\log\beta = 7,06$ dla $H(Amp)$ oraz $\log\beta = 9,61$ dla formy $H_2(Amp)$, co odpowiada wartościom $pK_{a1} = 2,55$ oraz $pK_{a2} = 7,06$. Uzyskane wyniki pozostają w dobrej zgodności z danymi literaturowymi ($pK_{a1} = 2,54$; $pK_{a2} = 7,30$), mimo zastosowania odmiennych warunków eksperymentalnych, w szczególności temperatury oraz siły jonowej roztworu.

Kolejny etap obejmował analizę procesów kompleksowania zachodzących w układach jon metalu–ampicylina. Pomiary potencjometryczne przeprowadzono zarówno dla układów o stosunku molowym metalu do liganda wynoszącym 1:1, jak i przy dwukrotnym nadmiarze ampicyliny. Opracowanie danych eksperymentalnych potwierdziło zdolność ampicyliny do tworzenia związków kompleksowych z jonami metali reprezentującymi różne bloki układu okresowego. Na podstawie danych eksperymentalnych wyznaczono wartości ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałych równowagi reakcji tworzenia kompleksów ($\log K_e$) (Tab. 2.).

Tabela 2. Ogólne wartości stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowagi reakcji chemicznych ($\log K_e$) dla kompleksów w układzie jon metalu/Ampicylina (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

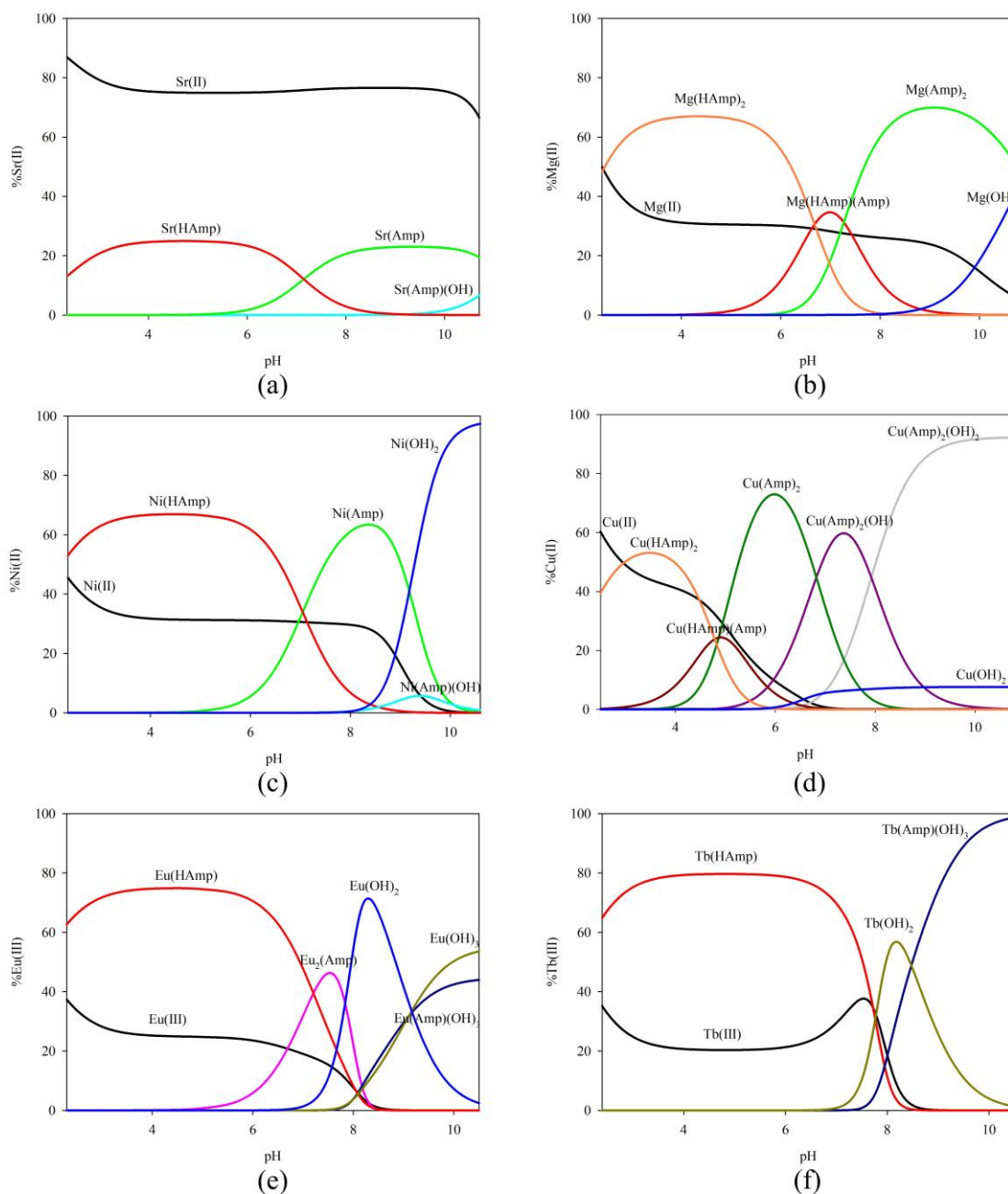
FORMA KOMPLEKSOWA		Mg(II)		Ca(II)		Sr(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HAmp)	9,85(5)	2,75	10,00(2)	2,90	9,99(1)	2,89
	M(Amp)	3,60(2)	3,60	-	-	2,60(7)	2,60
	M(Amp)(OH)	-	-	-	-	-8,56(5)	2,60
1:2	M(HAmp)	-	-	10,00(2)	2,90	9,99(1)	2,89
	M(HAmp) ₂	20,91(4)	6,72	-	-	-	-
	M(HAmp)(Amp)	14,23(5)	7,13	-	-	-	-
	M(Amp) ₂	6,96(4)	3,36	-	-	-	-
		Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HAmp)	9,99(6)	2,90	10,91(2)	3,82	10,36(4)	3,26
	M(Amp)	3,12(6)	3,12	3,86(1)	3,86	5,23(5)	5,23
	M(Amp)(OH)	-	-	-6,21(1)	3,70	0,29(2)	8,83
	M(Amp)(OH) ₂	-14,88(8)	12,66	-	-	-7,48(3)	5,99
	M(Amp)(OH) ₃	-25,33(4)	3,32	-	-	-18,67(4)	2,58
1:2	M(HAmp) ₂	20,49(4)	6,30	19,99(3)	5,80	20,54(2)	6,35
	M(HAmp)(Amp)	13,96(4)	6,86	13,60(3)	6,50	15,75(4)	8,66
	M(Amp) ₂	6,22(5)	3,10	6,27(2)	2,41	10,89(2)	5,65
	M(Amp) ₂ (OH)	-	-	-	-	4,06(2)	6,95
	M(Amp) ₂ (OH) ₂	-11,84(3)	9,47	-	-	-3,85(2)	5,85
		Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HAmp)	10,82(2)	3,72	10,76(4)	3,66	10,45(2)	3,35
	M(Amp)	3,42(2)	3,42	-	-	-	-
	M(Amp)(OH) ₃	-	-	-21,11(4)	20,20	-21,06(1)	20,24
	M ₂ (Amp)	-	-	7,47(3)	7,47	-	-
1:2	M(HAmp)	10,82(2)	3,72	10,76(4)	3,66	10,45(2)	3,35
	M(Amp)	3,42(2)	3,42	-	-	-	-
	M(HAmp)(Amp)	-	-	13,45(5)	13,45	-	-
	M(Amp) ₂	-	-	6,50(6)	6,50	-	-
	M(Amp)(OH) ₃	-	-	-	-	-21,06(1)	20,24
	M(Amp) ₂ (OH) ₃	-	-	-16,81(5)	4,22	-	-
	M(Amp) ₂ (OH) ₄	-	-	-26,77(4)	3,81	-	-

Układy zawierające jony metali bloku s charakteryzowały się stosunkowo niewielką liczbą identyfikowanych form kompleksowych (Rys. 8.). W niższym zakresie pH dominowały kompleksy typu M(HAmp), w których ligand występował w postaci częściowo protonowanej. Wraz ze wzrostem pH następowała stopniowa deprotonacja ampicyliny, której towarzyszyło tworzenie kompleksów typu M(Amp). Najbardziej złożony przebieg kompleksowania stwierdzono dla układów z jonami magnezu(II), szczególnie w obecności

nadmiaru liganda, gdzie stwierdzono obecność form zawierających dwie cząsteczki ampicyliny.

Znacznie większą różnorodność form kompleksowych oraz wyższe wartości stałych trwałości stwierdzono w układach zawierających jony metali bloku d (Rys. 8.). W przypadku jonów Co(II), Ni(II) oraz Cu(II) zidentyfikowano szeroki zestaw form kompleksowych obejmujących komplekty protonowane, zdeprotonowane oraz hydroksokompleksy. Największą trwałość wykazywały kompleksy miedzi(II), dla których obserwowano dominację form kompleksowych w szerokim zakresie pH, co świadczy o wysokim powinowactwie tego jonu do ampicyliny. Dodatkowo w warunkach nadmiaru liganda obserwowano powstawanie form o stechiometrii ML_2 , zawierających dwie cząsteczki ampicyliny skoordynowane do jednego jonu metalu.

Badania przeprowadzone dla jonów lantanowców(III) wykazały, że przebieg procesów kompleksowania zależy od rodzaju jonu metalu. W układach zawierających jony Nd(III), Eu(III) oraz Tb(III) dominowały kompleksy częściowo protonowane, natomiast wraz ze wzrostem pH następowało tworzenie hydroksokompleksów oraz wytrącanie wodorotlenków metali (Rys. 8.). Najbardziej złożone układy kompleksowe stwierdzono dla jonów europu(III), w których zidentyfikowano formy zawierające zarówno dwa jony metalu, jak i dwie cząsteczki ampicyliny.

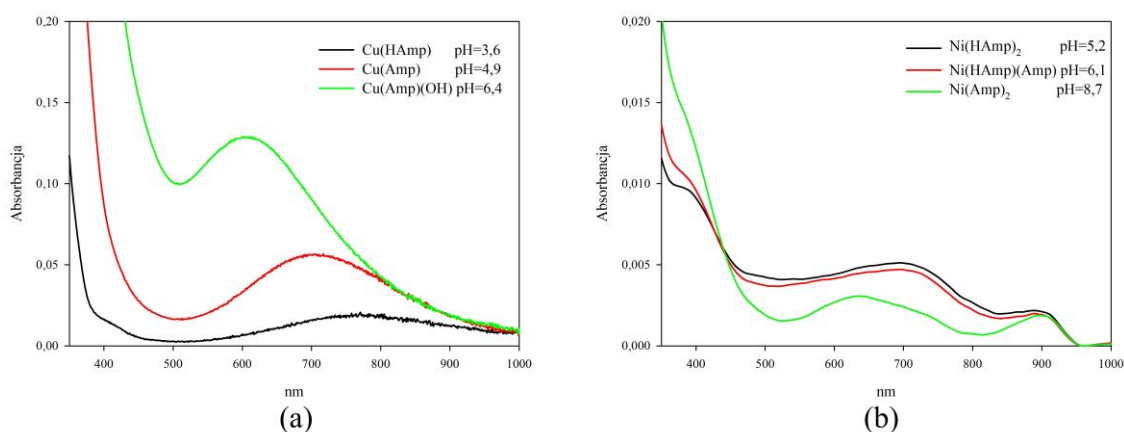


Rysunek 8. Krzywe dystrybucji form kompleksowych w układzie: (a) Sr(II)/Ampicylina (1:1); (b) Mg(II)/Ampicylina (1:2); (c) Ni(II)/Ampicylina (1:1); (d) Cu(II)/Ampicylina (1:2); (e) Eu(III)/Ampicylina (1:1); (f) Tb(III)/Ampicylina (1:2).

Analiza danych potencjometrycznych potwierdziła zdolność ampicyliny do tworzenia związków kompleksowych z badanymi jonami metali oraz umożliwiła określenie składu i trwałości powstających form kompleksowych. W celu weryfikacji procesu kompleksowania oraz identyfikacji centrów koordynacji ligandu przeprowadzono

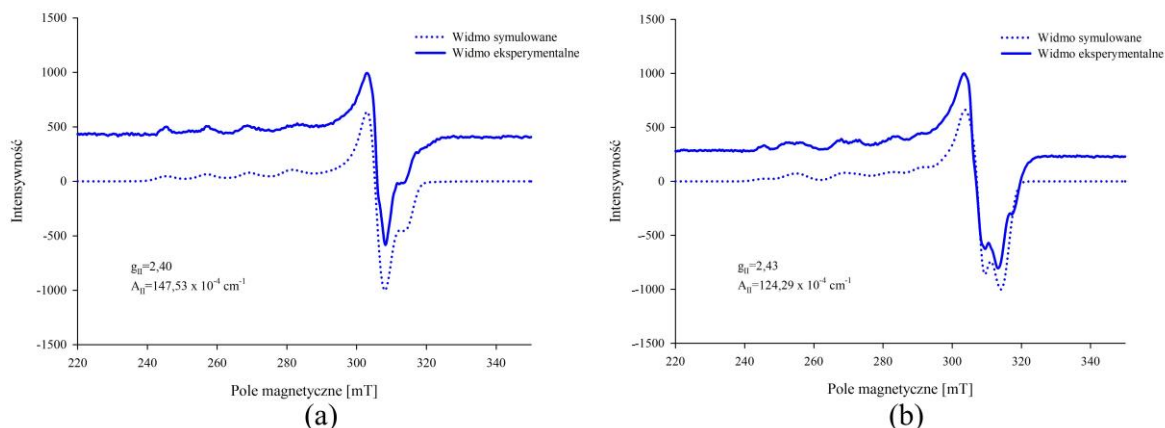
dotatkowe badania spektroskopowe z wykorzystaniem technik UV–Vis, EPR, FT-IR, CD oraz spektroskopii luminescencyjnej. Metody te dostarczyły informacji dotyczących sposobu koordynacji ampicyliny oraz zmian zachodzących w strukturze kompleksów pod wpływem oddziaływania z jonami metali.

Widma UV–Vis zarejestrowane dla układów zawierających jony Co(II), Ni(II) oraz Cu(II) wykazały zmiany położenia pasm absorpcyjnych oraz wartości absorbancji wraz ze zmianą pH roztworu (Rys. 9.). Obserwowane przesunięcia świadczyły o zmianach zachodzących w wewnętrznej sferze koordynacyjnej jonów metali podczas procesu kompleksowania. Przesunięcia pasm absorpcyjnych obserwowane wraz ze wzrostem pH potwierdzają zmianę składu wewnętrznej sfery koordynacyjnej kompleksów. W niższym zakresie pH, początkowo oddziaływania metalu z ligandem polegały głównie przez donorowe atomy tlenu, podczas gdy przy wyższych wartościach pH zwiększał się udział atomów azotu w tworzeniu wiązań koordynacyjnych.



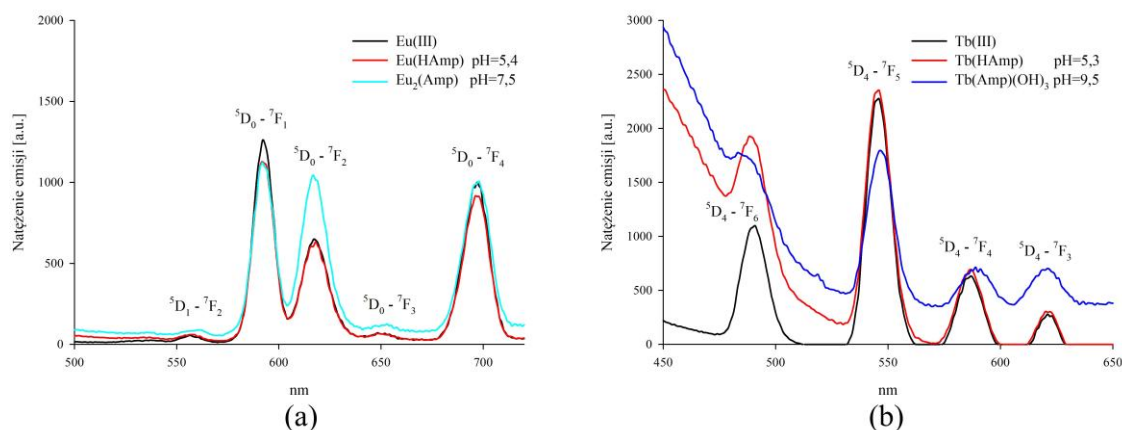
Rysunek 9. Widma UV-Vis dla układów: (a) Cu(II)/Ampicylina (1:1); (b) Ni(II)/Ampicylina (1:2).

W celu dokładniejszej charakterystyki wewnętrznej sfery koordynacyjnej jonów Cu(II) przeprowadzono badania z wykorzystaniem spektroskopii EPR (Rys. 10.). Analiza uzyskanych widm potwierdziła obecność monomerycznych form kompleksowych jonów miedzi(II) oraz wskazała na udział donorowych atomów tlenu w tworzeniu wiązań koordynacyjnych. Wraz ze wzrostem pH obserwowano zmiany parametrów spektroskopowych świadczące o zmianach zachodzących otoczenia koordynacyjnego jonu centralnego podczas tworzenia kolejnych form kompleksowych.



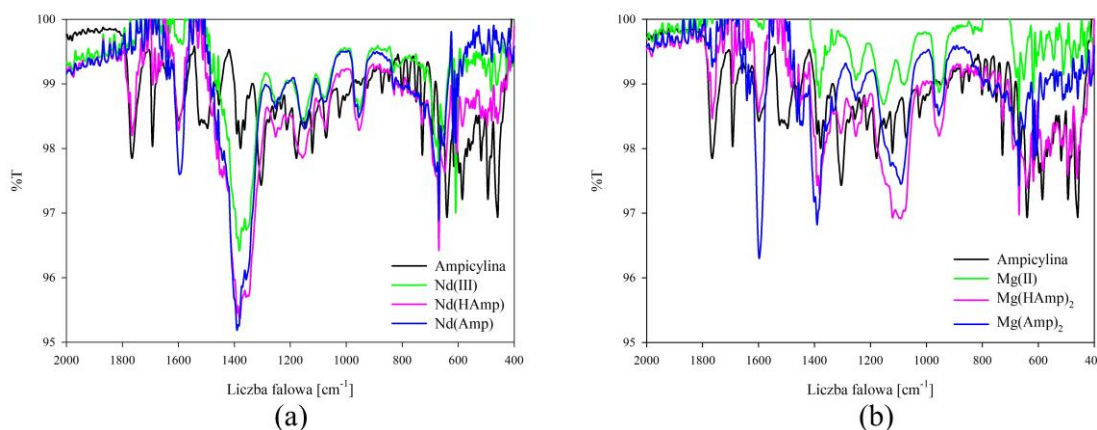
Rysunek 10. Widma EPR dla układów: (a) Cu(II)/Ampicylina (1:1) dla formy Cu(HAmp); (b) Cu(II)/Ampicylina (1:2) dla formy Cu(HAmp)₂.

Widma emisji zarejestrowane dla układów zawierających jony Eu(III) oraz Tb(III) wykazały wyraźne zmiany intensywności oraz położenia pasm emisji po utworzeniu kompleksów z ampicyliną (Rys. 11.). W przypadku kompleksów europu(III) zaobserwowano wygaszanie charakterystycznych pasm emisji, natomiast dla kompleksów terbu (III) stwierdzono zmiany intensywności oraz niewielkie przesunięcia pasm emisyjnych. Uzyskane wyniki potwierdziły oddziaływania ampicyliny z jonami lantanowców oraz wskazały na modyfikacje środowiska koordynacyjnego metalu zachodzące podczas procesu kompleksowania.



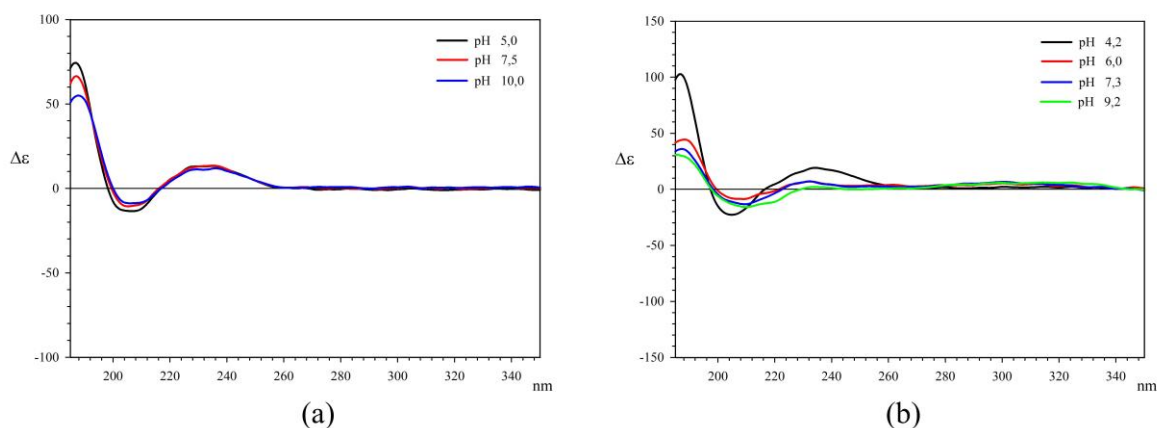
Rysunek 11. Widma emisji dla układów: (a) Eu(III)/Ampicylina (1:1); (b) Tb(III)/Ampicylina (1:2).

Analiza widm FT-IR dostarczyła istotnych informacji dotyczących sposobu koordynacji ampicyliny do badanych jonów metali (Rys. 12.). W porównaniu z widmem wolnego ligandu zaobserwowano wyraźne zmiany położenia oraz intensywności pasm charakterystycznych dla grup funkcyjnych obecnych w strukturze antybiotyku. Przesunięcia pasm związanych z drganiami grup karboksylowych, amidowych i aminowych wskazywały na udział donorowych atomów tlenu i azotu w tworzeniu wiązań koordynacyjnych. Dodatkowo zmiany obserwowane w zakresie pasm przypisywanych grupie karbonylowej pierścienia β -laktamowego sugerowały jej udział w oddziaływaniach z jonami metali. Wyniki spektroskopii FT-IR potwierdziły zatem wielomiejscowy charakter koordynacji ampicyliny oraz dostarczyły informacji na temat potencjalnych centrów koordynacyjnych ligandu.



Rysunek 12. Widma IR dla układów: (a) Nd(III)/Ampicylina (1:1); (b) Mg(II)/Ampicylina (1:2).

Badania dichroizmu kołowego wykazały, że proces kompleksowania nie prowadził do istotnych zmian konformacyjnych w strukturze ampicyliny (Rys. 13.). W całym badanym zakresie pH ligand zachowywał stabilność konformacyjną, a w większości analizowanych układów obserwowano jedynie niewielkie zmiany wartości efektów Cottona związane z tworzeniem wiązań z jonami metali. Najbardziej wyraźne różnice stwierdzono dla kompleksów Cu(II), co może wskazywać na odmienny charakter połączeń tego jonu z ampicyliną w porównaniu z pozostałymi badanymi metalami.



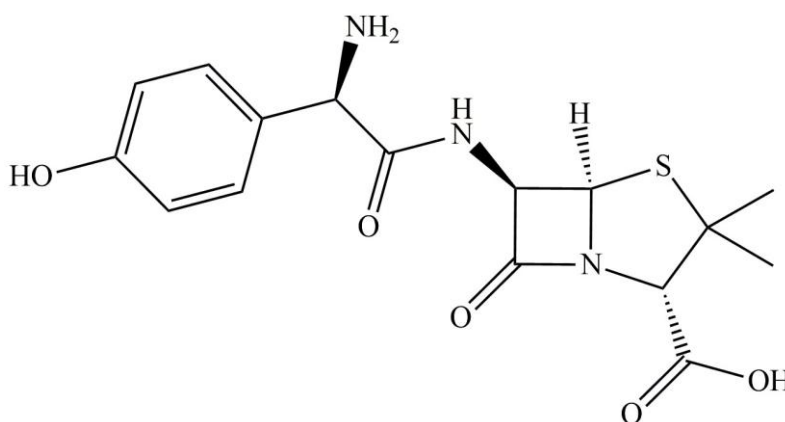
Rysunek 13. Widma CD dla układów: (a) Eu(III)/Ampicylina (1:1); (b) Cu(II)/Ampicylina (1:2).

Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły zdolność ampicyliny do tworzenia związków kompleksowych z jonami metali należącymi do bloków s, d i f układu okresowego. Wykazano, że rodzaju jonu metalu, pH oraz stosunek molowy mają istotny wpływ na skład i trwałość powstających form kompleksowych. Analiza danych potencjometrycznych umożliwiła opracowanie modeli równowagowych opisujących badane układy, natomiast zastosowane techniki spektroskopowe dostarczyły informacji dotyczących sposobu koordynacji ampicyliny oraz identyfikacji atomów donorowych uczestniczących w tworzeniu wiązań koordynacyjnych. Spośród wszystkich analizowanych układów największą trwałość wykazywały kompleksy Cu(II), co znalazło potwierdzenie zarówno w wartościach parametrów równowagowych, jak i w wynikach badań spektroskopowych.

4.2 Związki kompleksowe amoksycyliny (A2) - Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin

Druga publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej poświęcona była badaniom procesu kompleksowania amoksycyliny z jonami metali s-, d- i f-elektronowymi. Zakres badań obejmował jony Mg(II), Ca(II), Sr(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Nd(III), Eu(III), Tb(III).

Amoksycylina (Amox) (Rys. 14.), jest półsyntetycznym antybiotykiem β -laktamowym należącym do aminopenicylin. Pod względem budowy chemicznej wykazuje duże podobieństwo do ampicyliny, różniąc się obecnością dodatkowej grupy hydroksylowej w pierścieniu aromatycznym. Modyfikacja ta wpływa na właściwości farmakokinetyczne związku, prowadząc między innymi do zwiększenia biodostępności po podaniu doustnym oraz rozszerzenia zakresu zastosowań terapeutycznych. Antybiotyk ten jest powszechnie stosowany przede wszystkim w leczeniu zakażeń wywoływanych przez bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, zwłaszcza górnych dróg oddechowych, układu moczowego oraz przewodu pokarmowego.



Rysunek 14. Wzór amoksycyliny.

Pierwszy etap badań obejmował charakterystykę właściwości kwasowo-zasadowych amoksycyliny poprzez wyznaczenie jej ogólnych stałych protonowania. Na podstawie analizy danych potencjometrycznych otrzymano wartości $\log\beta$ równe 10,02 dla HAmox, 17,74 dla H₂Amox oraz 20,13 dla H₃Amox. Uzyskane wyniki wykazywały dobrą zgodność z wartościami literaturowymi, potwierdzając poprawność zastosowanego modelu równowagowego. Wielostopniowy przebieg protonowania wskazuje na obecność kilku centrów protonacji związanych z grupami funkcyjnymi zawierającymi atomy tlenu i azotu występującymi w strukturze amoksycyliny.

Badania potencjometryczne potwierdziły, że amoksycylina tworzy trwałe związki kompleksowe z badanymi jonami metali. Wykazano jednocześnie, że skład równowagowy układów oraz trwałość powstających form kompleksowych są silnie uzależnione od rodzaju jonu metalu i stosunku molowego metalu do liganda (Tab. 3.).

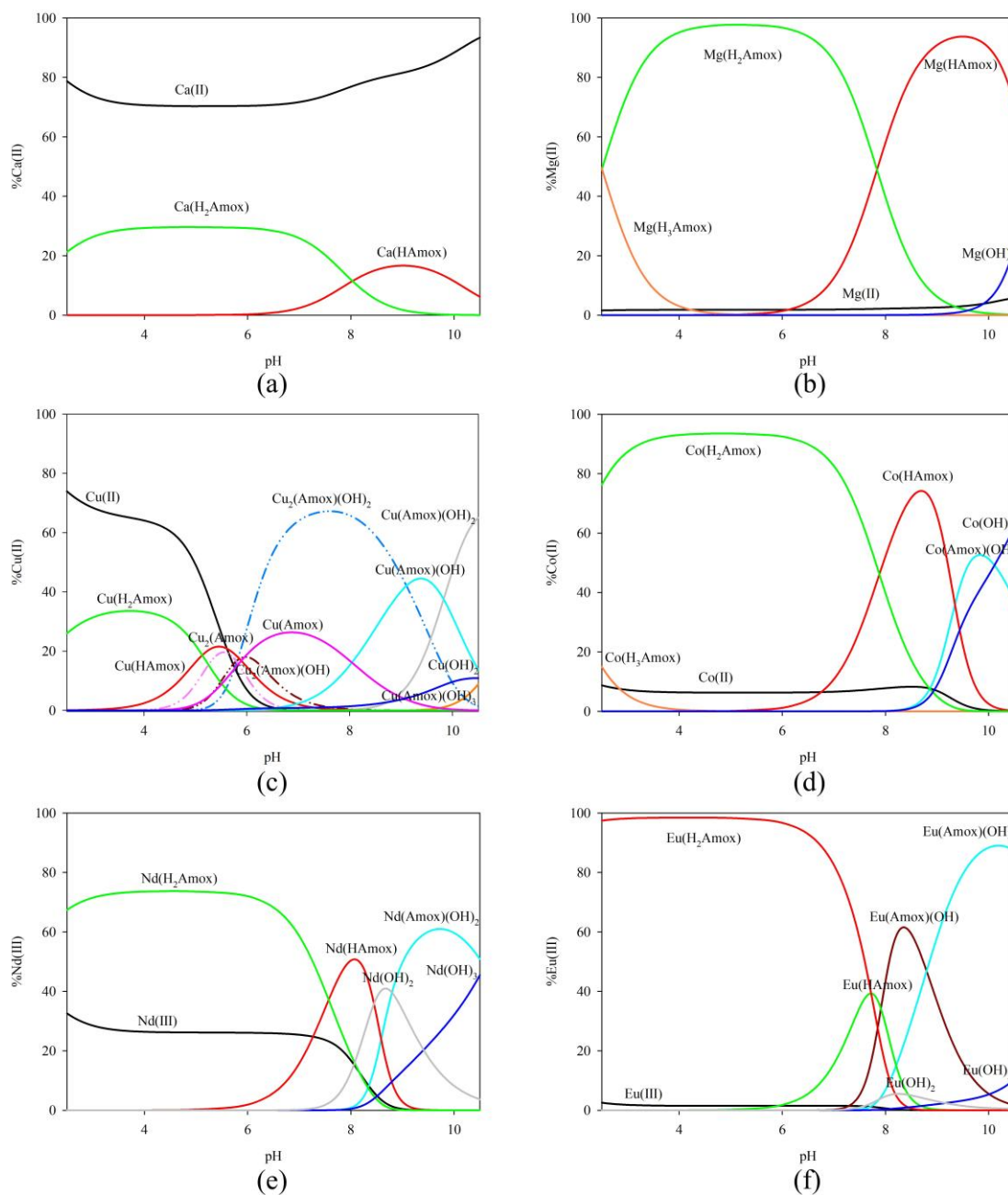
W układach zawierających jony metali bloku s dominowały protonowane formy kompleksowe typu $M(H_x Amox)$ (Rys. 15.). Największy procentowy udział jonów metali w procesie kompleksowania stwierdzono dla układów magnezu(II) oraz strontu(II), natomiast kompleksy wapnia(II) wykazywały mniejszą trwałość i ograniczoną liczbę identyfikowanych form kompleksowych.

Znacznie większą różnorodność form kompleksowych stwierdzono w układach zawierających jony metali bloku d. Dla jonów Co(II), Ni(II) i Cu(II) zidentyfikowano szeroki zestaw form obejmujący kompleksy protonowane, zdeprotonowane oraz hydroksylowe. Najbardziej złożony przebieg kompleksowania stwierdzono dla jonów Cu(II), dla których stwierdzono obecność form mono- oraz binuklearnych, a także kompleksów zawierających dwie cząsteczki amoksycyliny w sferze koordynacyjnej jonu metalu. Wraz ze wzrostem pH następowała stopniowa deprotonacja ligandu, prowadząca do powstawania kolejnych form hydroksylowych.

Układy zawierające jony lantanowców(III) charakteryzowały się dominacją protonowanych form kompleksowych oraz hydroksokompleksów. Największe powinowactwo do amoksycyliny wykazywały jony Eu(III), dla których w warunkach nadmiaru liganda obserwowano wysoki udział form kompleksowych. W przypadku Tb(III) dominowały natomiast formy hydroksylowe występujące w wyższym zakresie pH. Uzyskane wyniki potwierdzają, że proces kompleksowania jonów f-elektronowych jest w znacznym stopniu determinowany przez stopień deprotonacji ligandu oraz warunków środowiska reakcji, w szczególności wartość pH roztworu.

Tabela 3. Ogólne wartości stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowagi reakcji chemicznych ($\log K_e$) dla kompleksów w układzie jon metalu/Amoksycylina (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

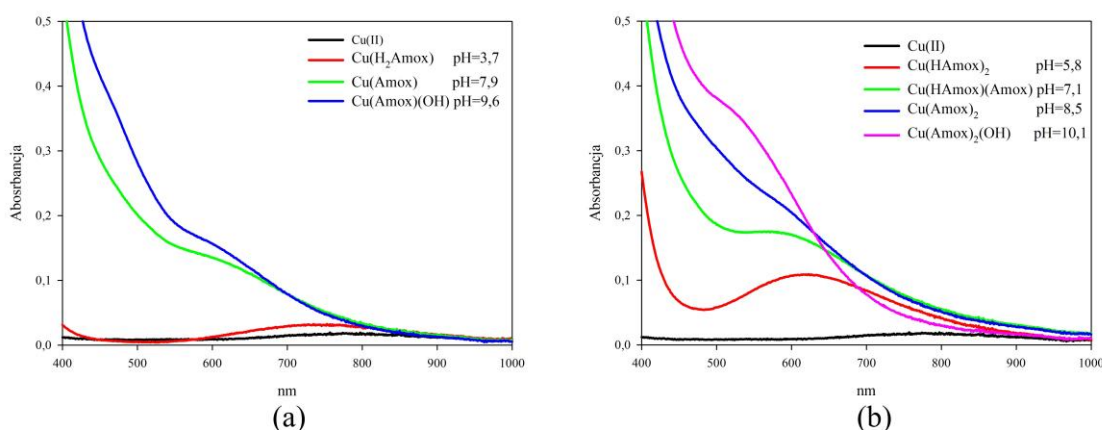
FORMA KOMPLEKSOWA		Mg(II)		Ca(II)		Sr(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(H ₃ Amox)	25,26(4)	5,13	-	-	24,20(6)	4,07
	M(H ₂ Amox)	23,85(4)	5,11	20,46(5)	2,73	21,68(6)	3,95
	M(HAmox)	15,02(3)	5,00	12,68(4)	2,66	13,98(5)	3,96
1:2	M(H ₃ Amox)	25,26(4)	5,13	-	-	24,20(6)	4,07
	M(H ₂ Amox)	23,85(4)	5,11	20,46(5)	2,73	21,68(6)	3,95
	M(HAmox)	15,02(3)	5,00	12,68(4)	2,66	13,98(5)	3,96
		Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(H ₃ Amox)	23,85(5)	3,72	24,33(4)	4,20	-	-
	M(H ₂ Amox)	21,86(3)	4,12	21,89(3)	4,15	20,66(3)	2,92
	M(HAmox)	13,96(2)	3,97	14,51(3)	4,49	15,52(6)	5,50
	M(Amox)	-	-	-	-	9,63(6)	9,63
	M(Amox) ₂	-	-	-	-	15,07(6)	15,07
	M(Amox)(OH)	-4,62(4)	9,15	-4,38(5)	9,39	1,59(2)	15,36
	M(Amox)(OH) ₂	-	-	-	-	-8,24(2)	3,94
	M(Amox)(OH) ₃	-	-	-	-	-19,60(3)	2,41
	M(Amox) ₂ (OH)	-	-	-	-	4,55(5)	3,25
	M(Amox) ₂ (OH) ₂	-	-	-	-	2,16(7)	11,37
1:2	M(H ₃ Amox)	23,85(5)	3,72	24,33(4)	4,20	-	-
	M(H ₂ Amox)	21,86(3)	4,12	21,89(3)	4,15	-	-
	M(HAmox)	13,96(2)	3,97	14,51(3)	4,49	-	-
	M(Amox)	-	-	4,60(6)	4,60	-	-
	M(HAmox) ₂	-	-	-	-	31,13(3)	11,09
	M(HAmox)(Amox)	-	-	-	-	24,94(3)	14,92
	M(Amox) ₂	-	-	-	-	15,07(6)	15,07
	M(Amox)(OH)	-4,62(4)	9,15	-4,38(5)	9,39	-	-
	M(Amox) ₂ (OH)	-	-	-	-	4,55(5)	3,25
	M(Amox) ₂ (OH) ₂	-	-	-	-	2,16(7)	11,37
	M(Amox) ₂ (OH) ₃	-	-	-	-	-13,70(6)	3,22
		Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(H ₂ Amox)	21,20(3)	3,46	22,41(5)	4,67	20,45(4)	2,71
	M(HAmox)	13,73(3)	3,71	14,65(5)	4,63	-	-
	M(Amox)(OH)	-	-	-1,02(5)	12,75	-	-
	M(Amox)(OH) ₂	-11,83(4)	15,71	-9,68(5)	5,10	-10,92(2)	11,20
	M(Amox)(OH) ₃	-	-	-	-	-22,55(3)	2,14
1:2	M(H ₂ Amox)	21,20(3)	3,46	22,41(5)	4,67	20,45(4)	2,71
	M(HAmox)	13,73(3)	3,71	14,65(5)	4,63	-	-
	M(Amox)(OH)	-	-	-1,02(5)	12,75	-2,93(3)	10,83
	M(Amox)(OH) ₂	-11,83(4)	15,71	-9,68(5)	5,10	-10,92(2)	11,20
	M(Amox)(OH) ₃	-	-	-	-	-22,55(3)	2,14



Rysunek 15. Krzywe dystrybucji form kompleksowych w układzie: (a) $\text{Ca(II)/Amoksycylina}$ (1:1); (b) $\text{Mg(II)/Amoksycylina}$ (1:2); (c) $\text{Cu(II)/Amoksycylina}$ (1:1); (d) $\text{Co(II)/Amoksycylina}$ (1:2); (e) $\text{Nd(III)/Amoksycylina}$ (1:1); (f) $\text{Eu(III)/Amoksycylina}$ (1:2).

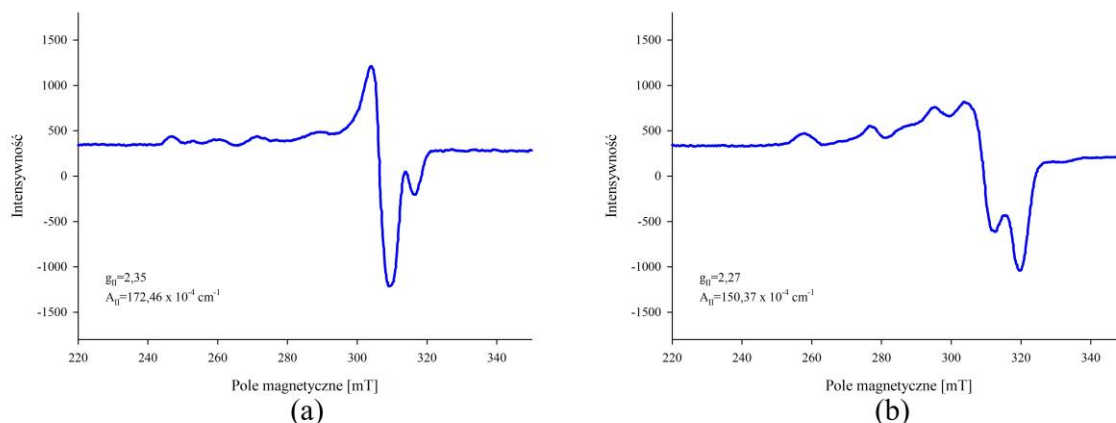
W celu weryfikacji procesu kompleksowania oraz identyfikacji środowiska koordynacyjnego jonów metali zastosowano komplementarne techniki spektroskopowe obejmujące UV-Vis, EPR, FT-IR oraz spektroskopię luminescencyjną.

Analiza widm UV–Vis zarejestrowanych dla układów Co(II), Ni(II) oraz Cu(II) wykazała istotne zmiany położenia maksimów absorpcji oraz intensywności pasm w funkcji pH (Rys. 16.). Obserwowane efekty wskazywały na modyfikację wewnętrznej sfery koordynacyjnej jonów metali, związaną z tworzeniem kolejnych form kompleksowych wraz ze zmianą stopnia protonacji ligandu, gdzie początkowo koordynacja zachodzi przez atomy tlenu grupy karboksylowej, a następnie ze wzrostem pH powstają kompleksy również z atomem azotu w wewnętrznej sferze koordynacyjnej.



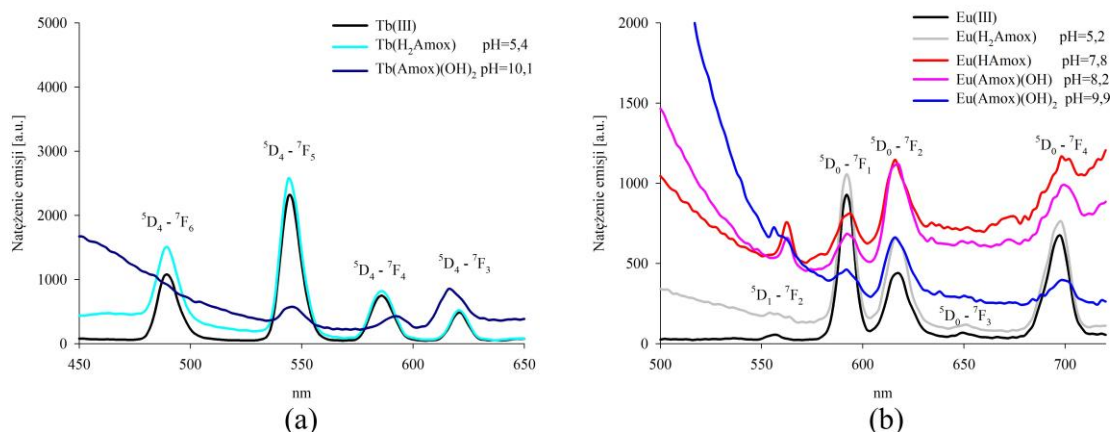
Rysunek 16. Widma UV-Vis dla układów: (a) Cu(II)/Amoksycylina (1:1); (b) Cu(II)/Amoksycylina (1:2).

Badania EPR potwierdziły obecność monojądrowych kompleksów Cu(II) o geometrii zbliżonej do kwadratowo-planarnej (Rys. 17.). Wyznaczone parametry spektroskopowe wskazywały udział donorowych atomów tlenu i azotu w tworzeniu wiązań koordynacyjnych z jonem metalu. Wraz ze wzrostem pH obserwowano zmiany parametrów $g_{\parallel}$ oraz $A_{\parallel}$, co świadczy o stopniowej przebudowie sfery koordynacyjnej związanej z deprotonacją liganda i powstawaniem kolejnych form kompleksowych. Uzyskane wyniki pozostają w zgodności z obserwacjami spektroskopowymi otrzymanymi metodą UV–Vis.



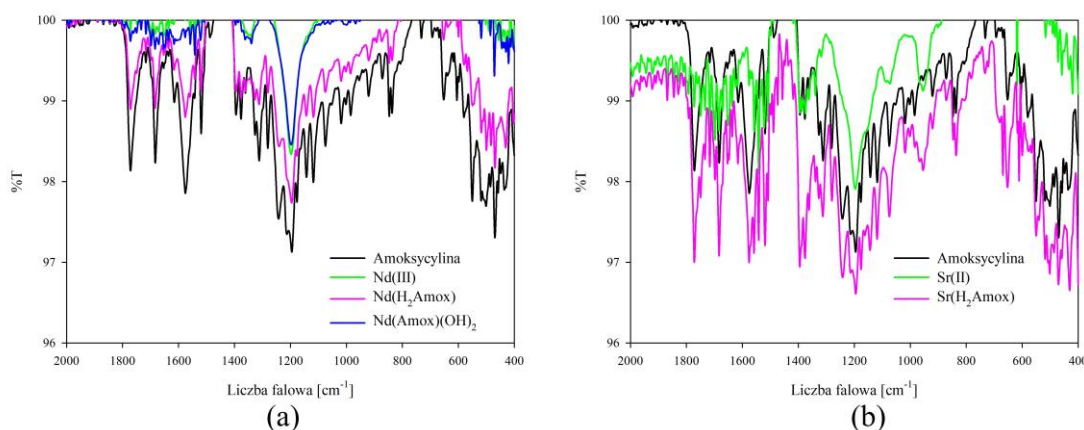
Rysunek 17. Widma EPR dla układów: (a) Cu(II)/Amoksycylina (1:1) dla formy $\text{Cu}(\text{H}_2\text{Amox})$; (b) Cu(II)/Amoksycylina (1:2) dla formy $\text{Cu}(\text{HAmox})_2$.

Widma emisyjne zarejestrowane dla układów zawierających jony Eu(III) oraz Tb(III) wykazały istotny wpływ procesu kompleksowania na właściwości emisyjne badanych układów (Rys. 18.). W przypadku kompleksów europu(III) zaobserwowano wzrost intensywności wybranych przejść emisyjnych dla form hydroksylowych, co wskazywało na zmiany w najbliższym otoczeniu koordynacyjnym jonu metalu. Natomiast dla jonów terbu(III) stwierdzono przesunięcia pasm emisyjnych oraz stopniowe wygaszanie emisji przy wyższych wartościach pH. Otrzymane wyniki potwierdziły zmiany zachodzące w otoczeniu jonów lantanowców podczas procesu kompleksowania.



Rysunek 18. Widma emisji dla układów: (a) Tb(III)/Amoksycylina (1:1); (b) Eu(III)/Amoksycylina (1:2).

Analiza widm FT-IR wykazała istotne zmiany położenia pasm charakterystycznych dla grup karboksylowych, amidowych oraz hydroksylowych obecnych w strukturze amoksycyliny (Rys. 19.). Zaobserwowane przesunięcia potwierdziły obecność oddziaływań koordynacyjnych z udziałem donorowych atomów tlenu i azotu oraz wskazały, że w utworzeniu wiązań koordynacyjnych uczestniczą na grupą karboksylowa i fragmenty pierścienia β -laktamowego.



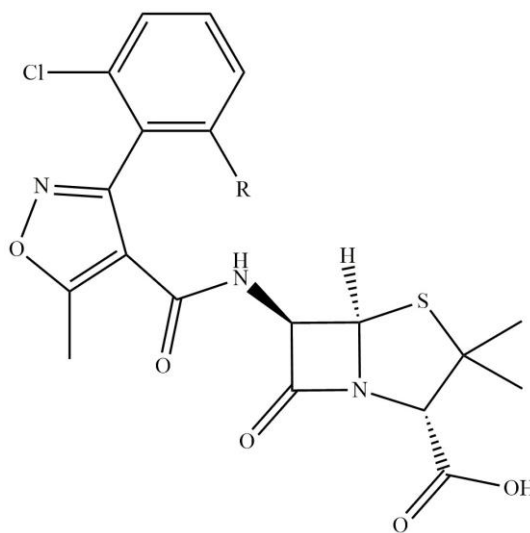
Rysunek 19. Widma IR dla układów: (a) Nd(III)/Amoksycylina (1:1); (b) Sr(III)/Amoksycylina (1:2).

Przeprowadzone badania potwierdziły, że amoksycylina, podobnie jak ampicylina, wykazuje zdolność do tworzenia trwałych związków kompleksowych z jonami metali reprezentującymi różne bloki układu okresowego. Wykazano, że przebieg procesów kompleksowania, skład powstających form oraz ich trwałość są determinowane przez rodzaj jonu metalu, stopień protonacji ligandu oraz stosunek molowy metalu do amoksycyliny. W porównaniu z układami ampicyliny stwierdzono większą różnorodność form kompleksowych tworzonych przez amoksycylinę, szczególnie w układach zawierających jony metali przejściowych oraz lantanowców. Połączenie metod potencjometrycznych i spektroskopowych umożliwiło dokładną charakterystykę równowag kompleksowania oraz identyfikację atomów donorowych uczestniczących w procesie koordynacji. Uzyskane wyniki rozszerzają wiedzę dotyczącą właściwości koordynacyjnych aminopenicylin oraz mogą stanowić podstawę dalszych badań nad wpływem jonów metali na właściwości biologiczne antybiotyków.

4.3 Związki kompleksowe kloksacyliny i dikloksacyliny (A3) - Metal–Antibiotic Interactions: Potentiometric and Spectroscopic Investigation of Cloxacillin and Dicloxacillin Complexes in Aqueous Solution

Trzecia publikacja stanowiąca część rozprawy doktorskiej obejmowała analizę procesów kompleksowania kloksacyliny i dikloksacyliny, będących przedstawicielami penicylin izoksazoliowych opornych na działanie β -laktamaz. Badania przeprowadzono z udziałem jonów Co(II), Ni(II), Cu(II), Nd(III), Eu(III) oraz Tb(III), reprezentujących bloki d i f układu okresowego pierwiastków.

Kloksacylina (Clox) oraz dikloksacylina (Diclox) (Rys. 20.) są półsyntetycznymi antybiotykami β -laktamowymi należącymi do grupy penicylin izoksazoliowych. W porównaniu z aminopenicylinami, takimi jak ampicylina i amoksycylina, charakteryzują się większą odpornością na hydrolizę katalizowaną przez β -laktamazy. Właściwość ta decyduje o ich skuteczności wobec bakterii Gram-dodatnich produkujących penicylinazy, w szczególności szczepów gronkowców. Z tego względu antybiotyki te znajdują zastosowanie w leczeniu zakażeń skóry, tkanek miękkich, kości oraz zakażeń układu oddechowego.



Rysunek 20. Wzór ogólny dla antybiotyków z grupy penicylin izoksazoliowych, gdzie R=H dla kloksacyliny, a R=Cl to dikloksacylina.

Pierwszy etap badań obejmował charakterystykę właściwości kwasowo-zasadowych kloksacyliny oraz dikloksacyliny. Wyznaczone wartości pK_a wynosiły odpowiednio 2,29 dla kloksacyliny oraz 3,55 dla dikloksacyliny. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność

dodatkowego atomu chloru w cząsteczce dikloksacyliny wpływa na zmianę właściwości kwasowo-zasadowych liganda. Zmiana ta może również wpływać na przebieg procesów kompleksowania poprzez zmianę dostępności potencjalnych centrów koordynacyjnych.

Analiza danych potencjometrycznych dla układów zawierających jony metali bloku d wykazała powstawanie licznych form kompleksowych zależnych od rodzaju jonu centralnego oraz stosunku molowego metal do ligandu (Tab. 4., Tab. 5., Rys. 21., Rys. 22.). W przypadku jonów Co(II) i Ni(II) dominowały kompleksy protonowane oraz zdeprotonowane formy kompleksowe występujące w zakresie pH obojętnego, natomiast wzrost wartości pH prowadził do tworzenia hydroksokompleksów oraz hydrolizy jonów metali. Najbardziej złożony przebieg kompleksowania stwierdzono dla jonów Cu(II), dla których zidentyfikowano obecność kompleksów mono- i bis-ligandowych oraz licznych form hydroksylowych. Szczególnie interesujące różnice zaobserwowano pomiędzy badanymi penicylin izoksazolilowych – w warunkach nadmiaru liganda kompleksy dikloksacyliny wykazywały większe wartości stałych trwałości oraz dominowały w szerszym zakresie pH niż analogiczne formy kompleksowe kloksacyliny. Wyniki te potwierdzają, że dodatkowy atom chloru obecny w strukturze dikloksacyliny wpływa nie tylko na właściwości kwasowo-zasadowe ligandu, lecz również na przebieg procesów kompleksowania.

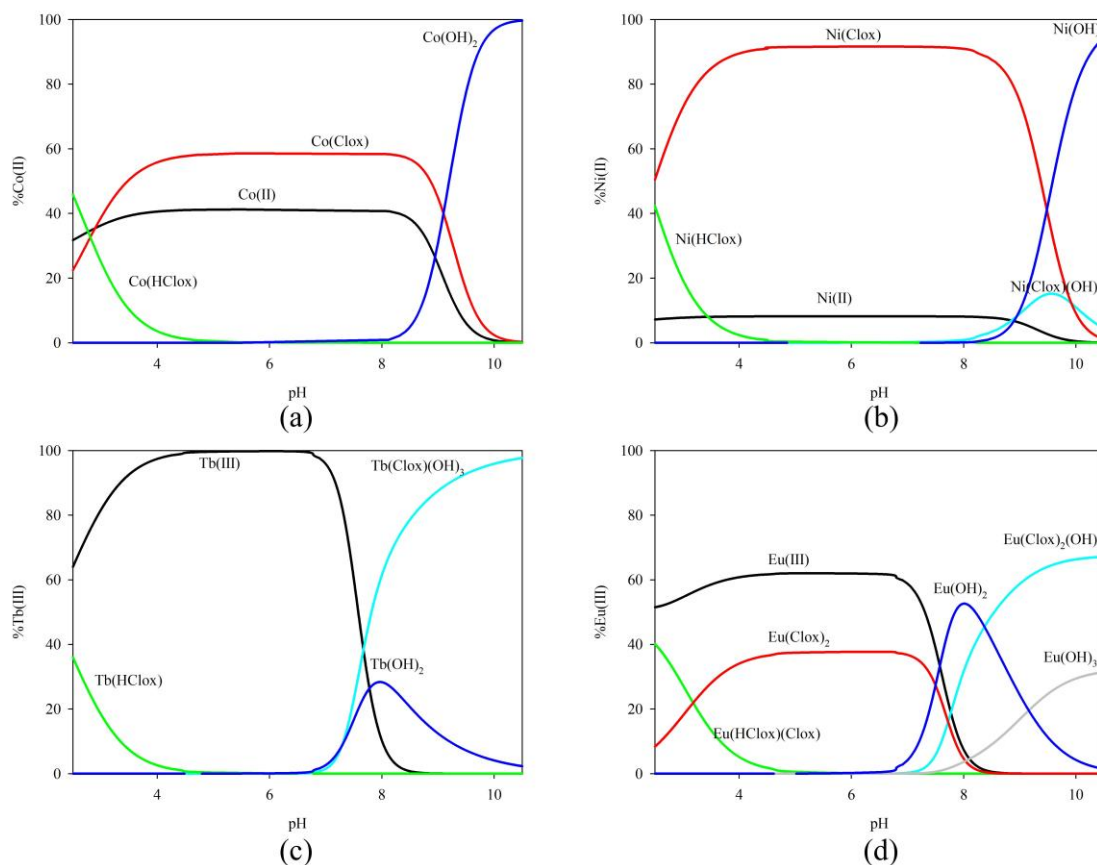
W badaniach układów zawierających jony lantanowców(III) dominującymi formami były kompleksy protonowane oraz hydroksokompleksy. Dla układów z jonami Nd(III), Eu(III) i Tb(III) obserwowano stopniową deprotonację ligandu wraz ze wzrostem wartości pH oraz tworzenie form zawierających jedną lub dwie cząsteczki antybiotyku w sferze koordynacyjnej jonu metalu. Największą trwałość kompleksów stwierdzono dla jonów terbu(III) oraz europu(III), szczególnie w układach z dikloksacyliną, gdzie powstające formy kompleksowe utrzymywały się w szerszym zakresie pH przed wystąpieniem procesów hydrolizy jonów metali.

Tabela 4. Ogólne wartości stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowagi reakcji chemicznych ($\log K_e$) dla kompleksów w układzie jon metalu/Kloksacylina (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

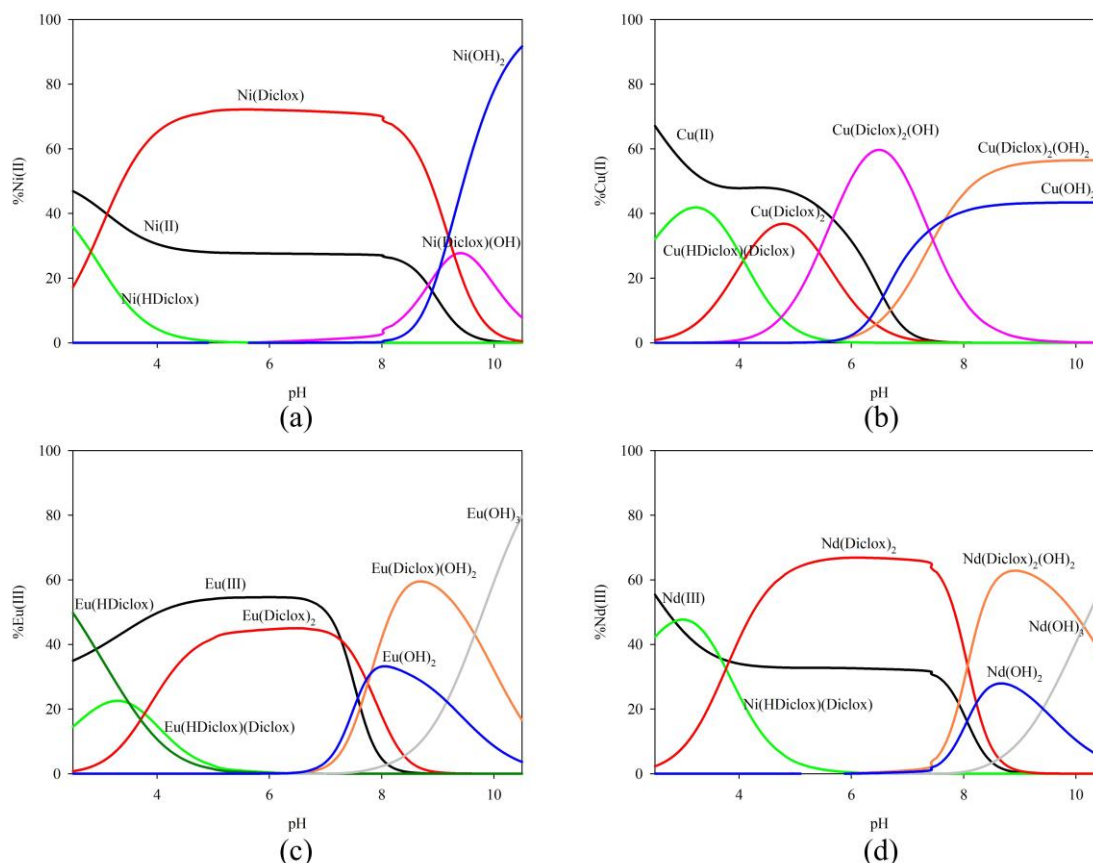
FORMA KOMPLEKSOWA		Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HClox)(Clox)	-	-	-	-	9,29(5)	6,99
	M(Clox) ₂	-	-	-	-	6,09(7)	6,09
	M(HClox)	6,02(5)	3,72	6,58(5)	4,29	-	-
	M(Clox)	3,52(1)	3,52	4,34(1)	4,34	-	-
	M(Clox) ₂ (OH)	-	-	-	-	0,15(4)	7,84
	M(Clox) ₂ (OH) ₃	-	-	-	-	-15,86(4)	11,60
1:2	M(HClox)	6,02(5)	3,72	6,58(5)	4,29	-	-
	M(Clox)	-	-	4,34(1)	4,34	-	-
	M(Clox)(OH)	-	-	-5,89(6)	3,85	-	-
	M(Clox)(OH) ₃	-25,71(2)	15,60	-	-	-	-
	M ₂ (HClox)	13,20(5)	10,90	-	-	-	-
	M ₂ (Clox)	6,98(1)	6,98	-	-	-	-
	M(Clox) ₂	-	-	-	-	6,09(7)	6,09
	M(Clox) ₂ (OH)	-	-	-	-	0,15(4)	7,84
		Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HClox)	5,52(2)	3,22	5,98(4)	3,69	5,45(2)	3,15
	M(Clox)	-	-	3,71(2)	3,71	-	-
	M(Clox)(OH) ₃	-21,58(1)	19,73	-20,89(4)	20,42	-19,79(1)	21,51
1:2	M(Clox)(HClox)	-	-	8,81(4)	6,52	8,70(10)	6,40
	M(Clox) ₂	6,40(5)	6,40	5,63(4)	5,63	5,97(9)	5,97
	M(Clox) ₂ (OH)	-1,73(12)	5,64	-	-	-	-
	M(Clox) ₂ (OH) ₂	-9,55(8)	5,95	-	-	-	-
	M(Clox) ₂ (OH) ₃	-17,28(4)	6,03	-17,54(3)	18,14	-16,37(6)	18,97

Tabela 5. Ogólne wartości stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowagi reakcji chemicznych ($\log K_e$) dla kompleksów w układzie jon metalu/Dikloksacylina (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

FORMA KOMPLEKSOWA		Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HDiclox)	6,58(3)	3,03	6,79(5)	3,24	-	-
	M(Diclox)	3,46(1)	3,46	4,23(5)	4,23	-	-
	M(Diclox)(OH)	-	-	-5,32(6)	8,45	-2,49(2)	11,28
	M(Diclox)(OH) ₂	-	-	-	-	-9,68(4)	17,87
1:2	M(HDiclox)(Diclox)	12,04(9)	8,49	-	-	10,71(5)	7,17
	M(Diclox) ₂	8,37(8)	8,37	7,83(6)	7,83	6,63(5)	6,63
	M(Diclox)	-	-	4,23(5)	4,23	-	-
	M(Diclox) ₂ (OH)	-	-	-0,97(9)	12,80	1,22(5)	14,99
	M(Diclox) ₂ (OH) ₂	-10,05(9)	17,49	-10,55(9)	16,99	-6,24(7)	21,30
		Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HDiclox)(Diclox)	-	-	11,33(6)	7,78	-	-
	M(Diclox) ₂	-	-	7,61(5)	7,61	-	-
	M(HDiclox)	-	-	7,43(4)	3,88	-	-
	M(Diclox)	3,29(3)	3,29	-	-	2,97(4)	2,97
	M(Diclox)(OH)	-4,73(5)	9,04	-	-	-	-
	M(Diclox)(OH) ₂	-12,64(3)	14,90	-11,34(3)	16,20	-12,37(5)	15,17
	M(Diclox)(OH) ₃	-	-	-	-	-21,50(4)	19,81
	M(Diclox) ₂ (OH) ₃	-	-	-	-	-17,07(3)	24,24
1:2	M(HDiclox) ₂	-	-	13,58(9)	6,48	-	-
	M(HDiclox)(Diclox)	11,07(6)	7,52	11,33(6)	7,78	-	-
	M(Diclox) ₂	7,30(4)	7,30	7,61(5)	7,61	-	-
	M(Diclox)	-	-	-	-	2,97(4)	2,97
	M(Diclox)(OH) ₂	-	-	-	-	-12,37(5)	15,17
	M(Diclox) ₂ (OH) ₂	-8,84(5)	18,70	-8,08(6)	19,46	-	-
	M(Diclox) ₂ (OH) ₃	-	-	-	-	-17,07(3)	24,24

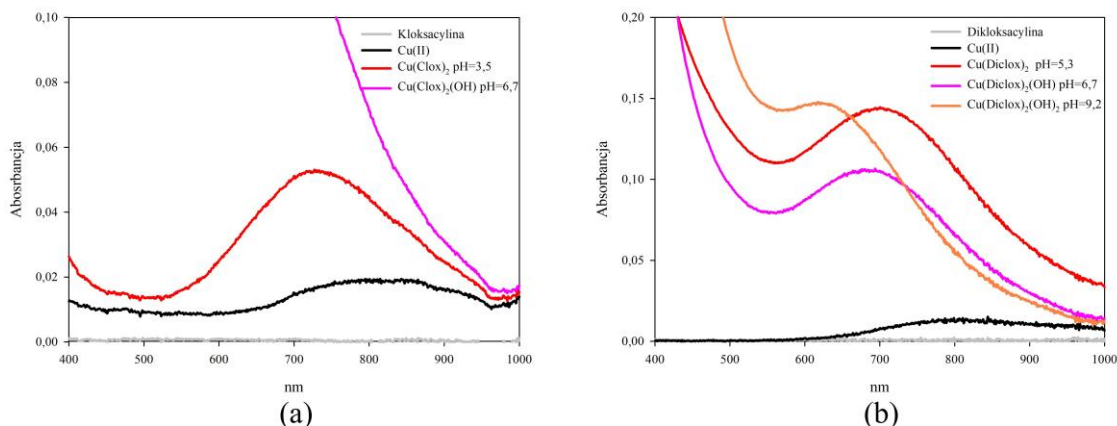


Rysunek 21. Krzywe dystrybucji form kompleksowych w układzie: (a) Co(II)/Kloksacylina (1:1); (b) Ni(II)/Kloksacylina (1:2); (c) Tb(III)/Kloksacylina (1:1); (d) Eu(III)/Kloksacylina (1:2).



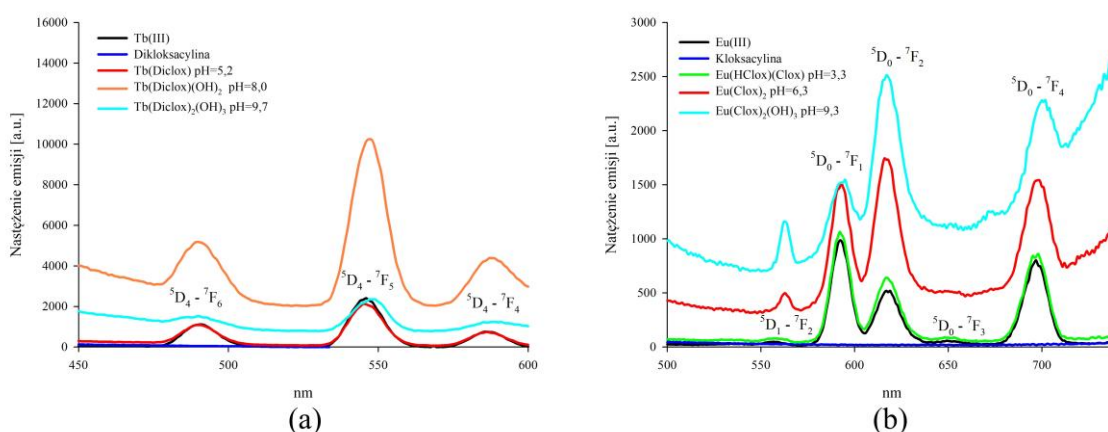
Rysunek 22. Krzywe dystrybucji form kompleksowych w układzie: (a) Ni(II)/Dikloksacylina (1:1); (b) Cu(II)/Dikloksacylina (1:2); (c) Eu(III)/Dikloksacylina (1:1); (d) Nd(III)/Dikloksacylina (1:2).

W celu potwierdzenia przebiegu procesów kompleksowania oraz identyfikacji centrów koordynacji ligandu przeprowadzono badania z wykorzystaniem spektroskopii UV–Vis, FT-IR oraz spektroskopii luminescencyjnej. Analiza widm UV–Vis zarejestrowanych dla układów zawierających jony Co(II), Ni(II) i Cu(II) wykazała istotne zmiany intensywności, kształtu oraz położenia pasm absorpcyjnych wraz ze zmianą wartości pH i stosunku molowego ligandu do jonu metalu (Rys. 23.). Obserwowane efekty wskazywały na zmiany zachodzące w sferze koordynacyjnej jonów metali związane z tworzeniem kolejnych form kompleksowych. Najbardziej wyraźne przesunięcia odnotowano dla układów Cu(II), szczególnie w obecności dikloksacyliny, co pozostawało w pełnej zgodności z wynikami badań potencjometrycznych wskazującymi na wysoką trwałość tych kompleksów.



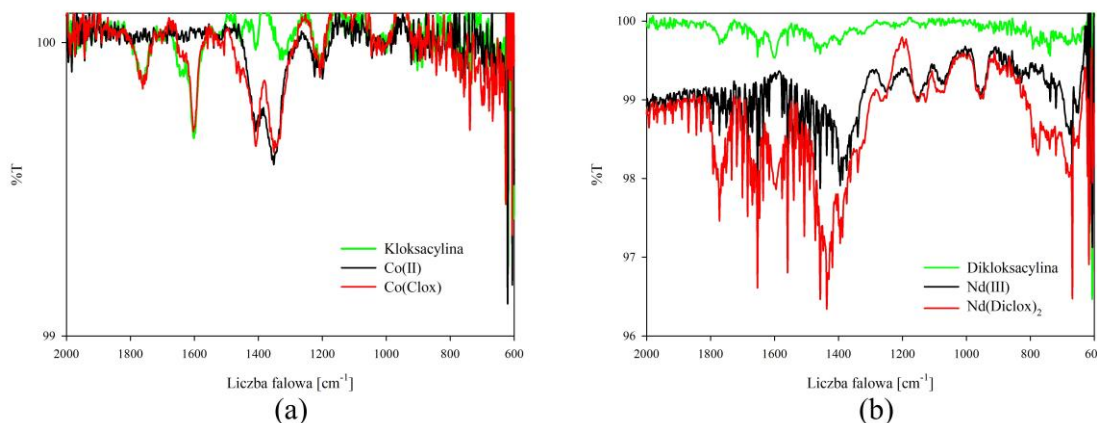
Rysunek 23. Widma UV-Vis dla układów: (a) Cu(II)/Kloksacylina (1:1); (b) Cu(II)/Dikloksacylina (1:2).

Badania luminescencyjne kompleksów jonów Eu(III) i Tb(III) wykazały istotne zmiany intensywności pasm emisji po utworzeniu kompleksów z badanymi antybiotykami (Rys. 24.). W przypadku układów zawierających dikloksacylinę obserwowano silniejsze efekty emisyjne oraz bardziej efektywny transfer energii ligand–metal w porównaniu do analogicznych kompleksów kloksacyliny. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność dodatkowego atomu chloru wpływa na trwałość, jak i właściwości spektroskopowe powstających kompleksów.



Rysunek 24. Widma emisji dla układów: (a) Tb(III)/Dikloksacylina (1:1); (b) Eu(III)/Kloksacylina (1:2).

Analiza widm FT-IR potwierdziła udział grup karboksylowych jako głównych centrów koordynacji jonów metali (Rys. 25.). Zaobserwowane przesunięcia pasm odpowiadających drganiom grup COO^- wskazywały na deprotonację grupy karboksylowej oraz jej bezpośredni udział w procesie tworzenia wiązań koordynacyjnych. Stwierdzono również niewielkie zmiany pasm związanych z grupami amidowymi, sugerujące dodatkowy udział tych fragmentów w stabilizacji powstających kompleksów.



Rysunek 25. Widma UV-Vis dla układów: (a) Co(II)/Kloksacylina (1:1); (b) Nd(III)/Dikloksacylina (1:2).

Przeprowadzone badania potwierdziły zdolność kloksacyliny i dikloksacyliny do tworzenia trwałych związków kompleksowych z jonami metali należącymi do bloków d i f układu okresowego. Wykazano, że niewielkie różnice strukturalne ligandu, związane z obecnością dodatkowego atomu chloru w cząsteczce dikloksacyliny, wpływają na trwałość powstających kompleksów, przebieg procesu kompleksowania oraz skład wewnętrznej sfery koordynacyjnej. Zastosowanie metod potencjometrycznych oraz spektroskopowych umożliwiło kompleksową charakterystykę procesów koordynacji oraz identyfikację głównych centrów wiązania jonów metali.

5. Podsumowanie i wnioski

Głównym celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu podstawników na trwałość termodynamiczną oraz właściwości spektroskopowe antybiotyków β -laktamowych z grupy penicylin na przebieg procesów kompleksowania oraz właściwości powstających związków kompleksowych z wybranymi jonami metali reprezentującymi bloki s, d i f układu okresowego. Realizacja założonego celu obejmowała analizę właściwości kwasowo-zasadowych badanych ligandów, wyznaczenie stałych trwałości powstających związków kompleksowych oraz określenie wpływu zmian strukturalnych w obrębie cząsteczek penicylin na przebieg procesów kompleksowania. Szczególną uwagę poświęcono ocenie wpływu wybranych modyfikacji strukturalnych, takich jak obecność grupy hydroksylowej, podstawników aromatycznych oraz atomów chloru, na właściwości koordynacyjne ligandów. Zastosowanie metod potencjometrycznych oraz komplementarnych technik spektroskopowych umożliwiło kompleksową charakterystykę badanych układów i określenie zależności pomiędzy budową chemiczną ligandów a właściwościami powstających związków kompleksowych.

W pierwszej publikacji (A1) poświęconej badaniom procesów kompleksowania ampicyliny, wykazano zdolność tego antybiotyku do tworzenia trwałych związków kompleksowych z jonami metali reprezentującymi bloki s, d i f układu okresowego. Przeprowadzone badania potwierdziły, że przebieg procesu kompleksowania oraz trwałość powstających form są determinowane zarówno przez właściwości jonu centralnego, jak i warunki środowiska reakcji. Obecność grup aminowej i karboksylowej w strukturze ampicyliny umożliwia efektywną koordynację jonów metali i sprzyja powstawaniu form o zróżnicowanej stechiometrii. Analiza parametrów równowagowych wykazała wyraźne różnice pomiędzy kompleksami tworzonymi przez jony należące do różnych bloków układu okresowego, co wskazuje na istotną rolę takich czynników, jak promień jonowy oraz konfiguracja elektronowa jonu metalu. Wyniki badań spektroskopowych umożliwiły identyfikację atomów donorowych uczestniczących w procesie koordynacji oraz potwierdziły udział grup aminowej, karboksylowej i karbonylowej w tworzeniu wiązań koordynacyjnych.

W drugiej publikacji (A2) wykazano, że wprowadzenie dodatkowej grupy hydroksylowej do struktury aminopenicyliny prowadzi do istotnych zmian jej właściwości kwasowo-zasadowych liganda oraz wpływa na stabilność tworzonych kompleksów.

Porównanie wyników uzyskanych dla ampicyliny i amoksycyliny pozwoliło stwierdzić, że modyfikacje strukturalne w obrębie pierścienia bocznego penicylin może prowadzić do zmian właściwości koordynacyjnych ligandu. Dodatkowa grupa hydroksylowa wpływała na rozkład gęstości elektronowej w cząsteczce, co znajdowało odzwierciedlenie w wartościach stałych trwałości oraz składzie powstających kompleksów. Analiza danych spektroskopowych potwierdziła udział grup karboksylowych oraz aminowych we wewnętrznej sferze koordynacyjnej, oraz wskazała na wpływ grupy hydroksylowej na właściwości strukturalne i spektroskopowe badanych układów. Uzyskane wyniki wykazały, że właściwości kompleksów penicylin są determinowane zarówno przez budowę chemiczną ligandu, jak i preferencje koordynacyjne jonu metalu. Badania te dostarczyły nowych informacji dotyczących zależności pomiędzy strukturą chemiczną aminopenicylin a ich właściwościami koordynacyjnymi.

W trzeciej publikacji (A3) wykazano, że obecność podstawników chlorowych oraz rozbudowanych ugrupowań aromatycznych w strukturze penicylin izoksazolidonowych istotnie wpływa na przebieg procesów kompleksowania oraz właściwości powstających związków kompleksowych. Uzyskane wyniki potwierdziły, że różnice w zachowaniu obu ligandów wobec jonów metali wskazują na wpływ efektów elektronowych i sterycznych na sposób koordynacji atomu centralnego. Otrzymane wyniki wykazały, że zwiększenie liczby atomów chloru w strukturze liganda wpływa na zmianę właściwości donorowych cząsteczki oraz może ograniczać dostępność centrów koordynacyjnych poprzez efekt steryczny. Analiza danych potencjometrycznych wykazała występowanie wyraźnych różnic pomiędzy kompleksami tworzonymi przez kloksacylinę i dikloksacylinę, szczególnie w układach zawierających jony metali bloku d i lantanowce. Badania spektroskopowe umożliwiły identyfikację grup funkcyjnych uczestniczących w procesie koordynacji oraz potwierdziły wpływ podstawników chlorowych na właściwości elektronowe badanych antybiotyków. Uzyskane wyniki potwierdziły istotną rolę efektów elektronowych i sterycznych w kształtowaniu właściwości koordynacyjnych penicylin izoksazolidonowych oraz wykazały, że nawet niewielkie modyfikacje strukturalne mogą prowadzić do znaczących zmian trwałości i charakteru tworzonych kompleksów.

Całość przeprowadzonych badań potwierdziła, że właściwości kompleksotwórcze antybiotyków β -laktamowych są silnie uzależnione zarówno od budowy chemicznej ligandów, jak i rodzaju zastosowanego jonu metalu. Wykazano, że obecność określonych grup funkcyjnych i podstawników w strukturze penicylin wpływa na trwałość

termodynamiczną tworzonych kompleksów, sposób koordynacji jonów metali oraz właściwości spektroskopowe badanych układów. Przeprowadzona analiza umożliwiła określenie zależności pomiędzy strukturą chemiczną antybiotyków a przebiegiem procesów kompleksowania, dostarczając nowych informacji dotyczących właściwości koordynacyjnych penicylin. Uzyskane wyniki stanowią istotne uzupełnienie aktualnego stanu wiedzy z zakresu chemii koordynacyjnej antybiotyków β -laktamowych oraz wskazują, że nawet niewielkie modyfikacje strukturalne ligandów mogą prowadzić do znaczących zmian właściwości tworzonych kompleksów. Otrzymane rezultaty mogą stanowić podstawę dalszych badań nad zależnościami pomiędzy strukturą kompleksów a ich właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi, a także nad rolą jonów metali w oddziaływaniach antybiotyków β -laktamowych w układach biologicznych.

Przeprowadzone badania mają istotne znaczenie poznawcze i przyczyniają się do poszerzenia wiedzy dotyczącej właściwości koordynacyjnych antybiotyków β -laktamowych. Uzyskane dane rozszerzają aktualny stan wiedzy dotyczący właściwości kompleksujących penicylin oraz wskazują na możliwość projektowania i badania nowych układów kompleksowych o potencjalnym znaczeniu biologicznym i farmaceutycznym. Wyniki rozprawy potwierdzają również zasadność interdyscyplinarnego podejścia badawczego łączącego metody chemii koordynacyjnej oraz techniki spektroskopowe umożliwiając pełniejszą charakterystykę oddziaływań pomiędzy antybiotykami a jonami metali w układach biologicznych.

6. Bibliografia

- [1] Aminov, R.I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front. Microbiol.* **2010**, *1*, doi:[10.3389/fmicb.2010.00134](https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134).
- [2] Harrison, F.; Orababa, O.Q. Microbial Primer: Ancientbiotics – Making Modern Antimicrobials from Historical Infection Remedies. *Microbiology* **2026**, *172*, doi:[10.1099/mic.0.001642](https://doi.org/10.1099/mic.0.001642).
- [3] Gould, K. Antibiotics: From Prehistory to the Present Day. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 572–575, doi:[10.1093/jac/dkv484](https://doi.org/10.1093/jac/dkv484).
- [4] Hutchings, M.I.; Truman, A.W.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, Present and Future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72–80, doi:[10.1016/j.mib.2019.10.008](https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008).
- [5] Landecker, H. Antimicrobials before Antibiotics: War, Peace, and Disinfectants. *Palgrave Commun.* **2019**, *5*, 45, doi:[10.1057/s41599-019-0251-8](https://doi.org/10.1057/s41599-019-0251-8).
- [6] Muteeb, G.; Rehman, M.T.; Shahwan, M.; Aatif, M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1615, doi:[10.3390/ph16111615](https://doi.org/10.3390/ph16111615).
- [7] Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929** Jun;10(3):226–36. PMID: PMC2048009.
- [8] Chain, E.; Florey, H.W.; Gardner, A.D.; Heatley, N.G.; Jennings, M.A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A.G. PENICILLIN AS A CHEMOTHERAPEUTIC AGENT. *Lancet* **1940**, *236*, 226–228, doi:[10.1016/S0140-6736\(01\)08728-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)08728-1).
- [9] Ligon, B.L. Penicillin: Its Discovery and Early Development. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **2004**, *15*, 52–57, doi:[10.1053/j.spid.2004.02.001](https://doi.org/10.1053/j.spid.2004.02.001).
- [10] Nobel Foundation. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945*. Available online: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/summary/>
- [11] Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417–433, doi:[10.1128/MMBR.00016-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10).
- [12] Clardy, J.; Fischbach, M.A.; Currie, C.R. The Natural History of Antibiotics. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, R437–R441, doi:[10.1016/j.cub.2009.04.001](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001).

-
- [13] Brown, E.D.; Wright, G.D. Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era. *Nature* **2016**, *529*, 336–343, doi:[10.1038/nature17042](https://doi.org/10.1038/nature17042).
- [14] Adedeji, W.A. THE TREASURE CALLED ANTIBIOTICS. *Ann. Ib. Postgrad. Med.* **2016**, *14*, 56–57.
- [15] Armstrong, G.L. Trends in Infectious Disease Mortality in the United States During the 20th Century. *JAMA* **1999**, *281*, 61, doi: [10.1001/jama.281.1.61](https://doi.org/10.1001/jama.281.1.61).
- [16] Blair, J.M.A.; Webber, M.A.; Baylay, A.J.; Ogbolu, D.O.; Piddock, L.J.V. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 42–51, doi:[10.1038/nrmicro3380](https://doi.org/10.1038/nrmicro3380).
- [17] Reygaert, W.C. An Overview of the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*, 482–501, doi:[10.3934/microbiol.2018.3.482](https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482).
- [18] Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 4.2.15, doi:[10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015).
- [19] Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281, doi:[10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x).
- [20] Prestinaci, F.; Pezzotti, P.; Pantosti, A. Antimicrobial Resistance: A Global Multifaceted Phenomenon. *Pathog. Glob. Health.* **2015**, *109*, 309–318, doi:[10.1179/2047773215Y.0000000030](https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030).
- [21] O'Neill, J. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*; Review on Antimicrobial Resistance: London, UK, 2016.
- [22] Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655, doi:[10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- [23] Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.M.; Wertheim, H.F.L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic Resistance—the Need
-

- for Global Solutions. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 1057–1098, doi:[10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).
- [24] Ferri, M.; Ranucci, E.; Romagnoli, P.; Giaccone, V. Antimicrobial Resistance: A Global Emerging Threat to Public Health Systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57*, 2857–2876, doi:[10.1080/10408398.2015.1077192](https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192).
- [25] Ventola, C.L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *P T* **2015**, *40*, 277–283.
- [26] Dadgostar, P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *Volume 12*, 3903–3910, doi:[10.2147/IDR.S234610](https://doi.org/10.2147/IDR.S234610).
- [27] Cassini, A.; Högberg, L.D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G.S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M.E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M.; et al. Attributable Deaths and Disability-Adjusted Life-Years Caused by Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A Population-Level Modelling Analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 56–66, doi:[10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4).
- [28] De Kraker, M.E.A.; Stewardson, A.J.; Harbarth, S. Will 10 Million People Die a Year Due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1002184, doi:[10.1371/journal.pmed.1002184](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184).
- [29] Smith, R.; Coast, J. The True Cost of Antimicrobial Resistance. *BMJ* **2013**, *346*, f1493–f1493, doi:[10.1136/bmj.f1493](https://doi.org/10.1136/bmj.f1493).
- [30] Fair, R.J.; Tor, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Med. Chem.* **2014**, *6*, PMC.S14459, doi:[10.4137/PMC.S14459](https://doi.org/10.4137/PMC.S14459).
- [31] Lewis, K. Platforms for Antibiotic Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 371–387, doi:[10.1038/nrd3975](https://doi.org/10.1038/nrd3975).
- [32] Payne, D.J.; Gwynn, M.N.; Holmes, D.J.; Pompliano, D.L. Drugs for Bad Bugs: Confronting the Challenges of Antibacterial Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 29–40, doi:[10.1038/nrd2201](https://doi.org/10.1038/nrd2201).
- [33] Bush, K.; Bradford, P.A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2016**, *6*, a025247, doi:[10.1101/cshperspect.a025247](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247).

- [34] Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J.; Collins, J.J. How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 423–435, doi:[10.1038/nrmicro2333](https://doi.org/10.1038/nrmicro2333).
- [35] Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **2017**, *33*, 300, doi:[10.4103/joacp.JOACP_349_15](https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15).
- [36] Fisher, J.F.; Meroueh, S.O.; Mobashery, S. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 395–424, doi:[10.1021/cr030102i](https://doi.org/10.1021/cr030102i).
- [37] Egan, A.J.F.; Errington, J.; Vollmer, W. Regulation of Peptidoglycan Synthesis and Remodelling. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 446–460, doi:[10.1038/s41579-020-0366-3](https://doi.org/10.1038/s41579-020-0366-3).
- [38] Vollmer, W.; Blanot, D.; De Pedro, M.A. Peptidoglycan Structure and Architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 149–167, doi:[10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x).
- [39] Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J.A.; Charlier, P. The Penicillin-Binding Proteins: Structure and Role in Peptidoglycan Biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 234–258, doi:[10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x).
- [40] Pazos, M.; Peters, K. Peptidoglycan. *Subcell. Biochem.* **2019**; Vol. 92, pp. 127–168 doi:[10.1007/978-3-030-18768-2_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_5).
- [41] Zapun, A.; Contreras-Martel, C.; Vernet, T. Penicillin-Binding Proteins and β -Lactam Resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 361–385, doi:[10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x).
- [42] Wilke, M.S.; Lovering, A.L.; Strynadka, N.C. β -Lactam Antibiotic Resistance: A Current Structural Perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 525–533, doi:[10.1016/j.mib.2005.08.016](https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016).
- [43] Lovering, A.L.; Safadi, S.S.; Strynadka, N.C.J. Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 451–478, doi:[10.1146/annurev-biochem-061809-112742](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-112742).
- [44] Narendrakumar, L.; Chakraborty, M.; Kumari, S.; Paul, D.; Das, B. β -Lactam Potentiators to Re-Sensitize Resistant Pathogens: Discovery, Development, Clinical Use and the Way Forward. *Front. Microbiol.* **2023**, *13*, 1092556, doi:[10.3389/fmicb.2022.1092556](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1092556).

- [45] Dik, D.A.; Fisher, J.F.; Mobashery, S. Cell-Wall Recycling of the Gram-Negative Bacteria and the Nexus to Antibiotic Resistance. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 5952–5984, doi:[10.1021/acs.chemrev.8b00277](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00277).
- [46] Cho, H.; Uehara, T.; Bernhardt, T.G. Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell* **2014**, *159*, 1300–1311, doi:[10.1016/j.cell.2014.11.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.017).
- [47] Tomasz, A. The Mechanism of the Irreversible Antimicrobial Effects of Penicillins: How the β -Lactam Antibiotics Kill and Lyse Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **1979**, *33*, 113–137, doi:[10.1146/annurev.mi.33.100179.000553](https://doi.org/10.1146/annurev.mi.33.100179.000553).
- [48] Bush, K.; Jacoby, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 969–976, doi:[10.1128/AAC.01009-09](https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09).
- [49] Tooke, C.L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E.C.; Colenso, C.K.; Hirvonen, V.H.A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 3472–3500, doi:[10.1016/j.jmb.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002).
- [50] Drawz, S.M.; Bonomo, R.A. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160–201, doi:[10.1128/CMR.00037-09](https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09).
- [51] Partridge, S.R.; Kwong, S.M.; Firth, N.; Jensen, S.O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00088-17, doi:[10.1128/CMR.00088-17](https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17).
- [52] Kumavath, R.; Gupta, P.; Tatta, E.R.; Mohan, M.S.; Salim, S.A.; Busi, S. Unraveling the Role of Mobile Genetic Elements in Antibiotic Resistance Transmission and Defense Strategies in Bacteria. *Front. Syst. Biol.* **2025**, *5*, 1557413, doi:[10.3389/fsysb.2025.1557413](https://doi.org/10.3389/fsysb.2025.1557413).
- [53] Husna, A.; Rahman, Md.M.; Badruzzaman, A.T.M.; Sikder, M.H.; Islam, M.R.; Rahman, Md.T.; Alam, J.; Ashour, H.M. Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2937, doi:[10.3390/biomedicines11112937](https://doi.org/10.3390/biomedicines11112937).
- [54] Cantón, R.; Coque, T.M. The CTX-M β -Lactamase Pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 466–475, doi:[10.1016/j.mib.2006.08.011](https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011).
- [55] Dashti, A.A.; Jadaon, M.M. Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) Gene Mutations in Kuwait: How Much Do We Know? Not Much! *Bacteria* **2025**, *4*, 22, doi:[10.3390/bacteria4020022](https://doi.org/10.3390/bacteria4020022).

- [56] Reading, C.; Cole, M. Clavulanic Acid: A Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces Clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 852–857, doi:[10.1128/AAC.11.5.852](https://doi.org/10.1128/AAC.11.5.852).
- [57] Yahav, D.; Giske, C.G.; Grāmatniece, A.; Abodakpi, H.; Tam, V.H.; Leibovici, L. New β -Lactam– β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin. Microbiol. Rev.* **2020**, *34*, e00115-20, doi:[10.1128/CMR.00115-20](https://doi.org/10.1128/CMR.00115-20).
- [58] Sargianou, M.; Stathopoulos, P.; Vrysis, C.; Tzvetanova, I.D.; Falagas, M.E. New β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combination Antibiotics. *Pathogens* **2025**, *14*, 307, doi:[10.3390/pathogens14040307](https://doi.org/10.3390/pathogens14040307).
- [59] Tehrani, K.H.M.E.; Martin, N.I. β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations: An Update. *Med. Chem. Commun.* **2018**, *9*, 1439–1456, doi:[10.1039/C8MD00342D](https://doi.org/10.1039/C8MD00342D).
- [60] Lima, L.M.; Silva, B.N.M.D.; Barbosa, G.; Barreiro, E.J. β -Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *208*, 112829, doi:[10.1016/j.ejmech.2020.112829](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829).
- [61] Tamma, P.D.; Aitken, S.L.; Bonomo, R.A.; Mathers, A.J.; Van Duin, D.; Clancy, C.J. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas Aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR- *P. Aeruginosa*). *Clin. Infect. Dis.* **2021**, *72*, e169–e183, doi:[10.1093/cid/ciaa1478](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1478).
- [62] Mato, S.; Mata, S.; Alonso, E.R.; León, I. Revealing the Structure of 6-Aminopenicillanic Acid: The Active Nucleus of Penicillins. *J. Phys. Chem. Lett.* **2024**, *15*, 1908–1913, doi:[10.1021/acs.jpcclett.3c03301](https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.3c03301).
- [63] Rolinson, G.N.; Geddes, A.M. The 50th Anniversary of the Discovery of 6-Aminopenicillanic Acid (6-APA). *Int. J. Antimicrob. Agents* **2007**, *29*, 3–8, doi:[10.1016/j.ijantimicag.2006.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.09.003).
- [64] Page, M.I. (Ed.) *The Chemistry of β -Lactams*; Springer Netherlands: Dordrecht, The Netherlands, 1992; doi:[10.1007/978-94-011-2928-2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2928-2).
- [65] Miyachiro, M.M.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A. Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and Bacterial Cell Wall Elongation Complexes. In *Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function*; Harris, J.R.; Marles-Wright, J., Eds.; Springer International

- Publishing: Cham, Switzerland, 2019; Vol. 93; pp. 273–289; doi:[10.1007/978-3-030-28151-9_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28151-9_8)
- [66] Elander, R.P. Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 385–392, doi:[10.1007/s00253-003-1274-y](https://doi.org/10.1007/s00253-003-1274-y).
- [67] Chambers, H.F.; DeLeo, F.R. Waves of Resistance: Staphylococcus Aureus in the Antibiotic Era. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 629–641, doi:[10.1038/nrmicro2200](https://doi.org/10.1038/nrmicro2200).
- [68] Bush, K.; Bradford, P.A. Interplay between β -Lactamases and New β -Lactamase Inhibitors. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 295–306, doi:[10.1038/s41579-019-0159-8](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0159-8).
- [69] Pichichero, M.E. A Review of Evidence Supporting the American Academy of Pediatrics Recommendation for Prescribing Cephalosporin Antibiotics for Penicillin-Allergic Patients. *Pediatrics* **2005**, *115*, 1048–1057, doi:[10.1542/peds.2004-1276](https://doi.org/10.1542/peds.2004-1276).
- [70] Blumenthal, K.G.; Peter, J.G.; Trubiano, J.A.; Phillips, E.J. Antibiotic Allergy. *Lancet* **2019**, *393*, 183–198, doi:[10.1016/S0140-6736\(18\)32218-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32218-9).
- [71] Shenoy, E.S.; Macy, E.; Rowe, T.; Blumenthal, K.G. Evaluation and Management of Penicillin Allergy: A Review. *JAMA* **2019**, *321*, 188, doi:[10.1001/jama.2018.19283](https://doi.org/10.1001/jama.2018.19283).
- [72] Khonsary, S.A. Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. *Surg. Neurol. Int.* **2023**, *14*, 91, doi:[10.25259/SNI_184_2023](https://doi.org/10.25259/SNI_184_2023).
- [73] Katzung, B.G. *Basic and Clinical Pharmacology*, 15th ed.; McGraw-Hill Education: New York, NY, USA, **2021**; ISBN 9781260452310.
- [74] Lobanovska, M.; Pilla, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J. Biol. Med.* **2017**, *90*, 135–145. PMID: 28356901.
- [75] Kong, K.; Schneper, L.; Mathee, K. Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS* **2010**, *118*, 1–36, doi:[10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x).
- [76] Waldron, K.J.; Rutherford, J.C.; Ford, D.; Robinson, N.J. Metalloproteins and Metal Sensing. *Nature* **2009**, *460*, 823–830, doi:[10.1038/nature08300](https://doi.org/10.1038/nature08300).
- [77] Anastassopoulou, J.; Theophanides, T. The Role of Metal Ions in Biological Systems and Medicine. In *Bioinorganic Chemistry*; Kessissoglou, D.P., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1995; pp. 209–218, doi:[10.1007/978-94-011-0255-1_17](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0255-1_17)

- [78] Barry, N.P.E.; Sadler, P.J. Exploration of the Medical Periodic Table: Towards New Targets. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 5106, doi:[10.1039/c3cc41143e](https://doi.org/10.1039/c3cc41143e).
- [79] Fraga, C.G. Relevance, Essentiality and Toxicity of Trace Elements in Human Health. *Mol. Asp. Med.* **2005**, 26, 235–244, doi:[10.1016/j.mam.2005.07.013](https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.013).
- [80] Maret, W. The Metals in the Biological Periodic System of the Elements: Concepts and Conjectures. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 66, doi:[10.3390/ijms17010066](https://doi.org/10.3390/ijms17010066).
- [81] Sherry, A.D.; Caravan, P.; Lenkinski, R.E. Primer on Gadolinium Chemistry. *Magn. Reson. Imaging* **2009**, 30, 1240–1248, doi:[10.1002/jmri.21966](https://doi.org/10.1002/jmri.21966).
- [82] Bünzli, J.-C.G. Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2729–2755, doi:[10.1021/cr900362e](https://doi.org/10.1021/cr900362e).
- [83] Mjos, K.D.; Orvig, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4540–4563, doi:[10.1021/cr400460s](https://doi.org/10.1021/cr400460s).
- [84] Eliseeva, S.V.; Bünzli, J.-C.G. Lanthanide Luminescence for Functional Materials and Bio-Sciences. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 189–227, doi:[10.1039/B905604C](https://doi.org/10.1039/B905604C).
- [85] Bünzli, J.-C.G. Review: Lanthanide Coordination Chemistry: From Old Concepts to Coordination Polymers. *J. Coord. Chem.* **2014**, 67, 3706–3733, doi:[10.1080/00958972.2014.957201](https://doi.org/10.1080/00958972.2014.957201).
- [86] Haas, K.L.; Franz, K.J. Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4921–4960, doi:[10.1021/cr900134a](https://doi.org/10.1021/cr900134a).
- [87] Aziz, K.N.; Ahmed, K.M.; Omer, R.A.; Qader, A.F.; Abdulkareem, E.I. A Review of Coordination Compounds: Structure, Stability, and Biological Significance. *Rev. Inorg. Chem.* **2025**, 45, 1–19, doi:[10.1515/revic-2024-0035](https://doi.org/10.1515/revic-2024-0035).
- [88] Clapham, D.E. Calcium Signaling. *Cell* **2007**, 131, 1047–1058, doi:[10.1016/j.cell.2007.11.028](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028).
- [89] Peacock, M. Calcium Metabolism in Health and Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, 5, S23–S30, doi:[10.2215/CJN.05910809](https://doi.org/10.2215/CJN.05910809).
- [90] Dudev, T.; Lim, C. Competition among Metal Ions for Protein Binding Sites: Determinants of Metal Ion Selectivity in Proteins. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 538–556, doi:[10.1021/cr4004665](https://doi.org/10.1021/cr4004665).

- [91] De Baaij, J.H.F.; Hoenderop, J.G.J.; Bindels, R.J.M. Magnesium in Man: Implications for Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 1–46, doi:[10.1152/physrev.00012.2014](https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2014).
- [92] Cowan, J.A. Structural and Catalytic Chemistry of Magnesium-Dependent Enzymes. *BioMetals* **2002**, *15*, 225–235, doi:[10.1023/A:1016022730880](https://doi.org/10.1023/A:1016022730880).
- [93] DiNicolantonio, J.J.; O’Keefe, J.H.; Wilson, W. Subclinical Magnesium Deficiency: A Principal Driver of Cardiovascular Disease and a Public Health Crisis. *Open Heart* **2018**, *5*, e000668, doi:[10.1136/openhrt-2017-000668](https://doi.org/10.1136/openhrt-2017-000668).
- [94] Dahl, S.G.; Allain, P.; Marie, P.J.; Mauras, Y.; Boivin, G.; Ammann, P.; Tsouderos, Y.; Delmas, P.D.; Christiansen, C. Incorporation and Distribution of Strontium in Bone. *Bone* **2001**, *28*, 446–453, doi:[10.1016/S8756-3282\(01\)00419-7](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00419-7).
- [95] Marie, P. Strontium as Therapy for Osteoporosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 633–636, doi:[10.1016/j.coph.2005.05.005](https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.05.005).
- [96] Parker, C.; Castro, E.; Fizazi, K.; Heidenreich, A.; Ost, P.; Procopio, G.; Tombal, B.; Gillessen, S. Prostate Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 1119–1134, doi:[10.1016/j.annonc.2020.06.011](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.011).
- [97] Linder, M.C. Ceruloplasmin and Other Copper Binding Components of Blood Plasma and Their Functions: An Update. *Metallomics* **2016**, *8*, 887–905, doi:[10.1039/C6MT00103C](https://doi.org/10.1039/C6MT00103C).
- [98] Ge, E.J.; Bush, A.I.; Casini, A.; Cobine, P.A.; Cross, J.R.; DeNicola, G.M.; Dou, Q.P.; Franz, K.J.; Gohil, V.M.; Gupta, S.; et al. Connecting Copper and Cancer: From Transition Metal Signalling to Metalloplasia. *Nat. Rev. Cancer* **2022**, *22*, 102–113, doi:[10.1038/s41568-021-00417-2](https://doi.org/10.1038/s41568-021-00417-2).
- [99] Festa, R.A.; Thiele, D.J. Copper: An Essential Metal in Biology. *Curr. Biol.* **2011**, *21*, R877–R883, doi:[10.1016/j.cub.2011.09.040](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040).
- [100] Roessler, M.M.; Salvadori, E. Principles and Applications of EPR Spectroscopy in the Chemical Sciences. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 2534–2553, doi:[10.1039/C6CS00565A](https://doi.org/10.1039/C6CS00565A).
- [101] Banerjee, R.; Ragsdale, S.W. The Many Faces of Vitamin B₁₂: Catalysis by Cobalamin-Dependent Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 209–247, doi:[10.1146/annurev.biochem.72.121801.161828](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161828).

- [102] Watanabe, F.; Bito, T. Vitamin B₁₂ Sources and Microbial Interaction. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2018**, *243*, 148–158, doi:[10.1177/1535370217746612](https://doi.org/10.1177/1535370217746612).
- [103] Thariat, J.; Hannoun-Levi, J.-M.; Sun Myint, A.; Vuong, T.; Gérard, J.-P. Past, Present, and Future of Radiotherapy for the Benefit of Patients. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10*, 52–60, doi:[10.1038/nrclinonc.2012.203](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.203).
- [104] Ragsdale, S.W. Nickel-Based Enzyme Systems. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18571–18575, doi:[10.1074/jbc.R900020200](https://doi.org/10.1074/jbc.R900020200).
- [105] Boer, J.L.; Mulrooney, S.B.; Hausinger, R.P. Nickel-Dependent Metalloenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *544*, 142–152, doi:[10.1016/j.abb.2013.09.002](https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.09.002).
- [106] Genchi, G.; Carocci, A.; Lauria, G.; Sinicropi, M.S.; Catalano, A. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 679, doi:[10.3390/ijerph17030679](https://doi.org/10.3390/ijerph17030679).
- [107] Kaczmarek, M.T.; Zabiszak, M.; Nowak, M.; Jastrzab, R. Lanthanides: Schiff Base Complexes, Applications in Cancer Diagnosis, Therapy, and Antibacterial Activity. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *370*, 42–54, doi:[10.1016/j.ccr.2018.05.012](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.05.012).
- [108] Hemmilä, I.; Laitala, V. Progress in Lanthanides as Luminescent Probes. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 529–542, doi:[10.1007/s10895-005-2826-6](https://doi.org/10.1007/s10895-005-2826-6).
- [109] Wang, X.; Chang, H.; Xie, J.; Zhao, B.; Liu, B.; Xu, S.; Pei, W.; Ren, N.; Huang, L.; Huang, W. Recent Developments in Lanthanide-Based Luminescent Probes. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *273–274*, 201–212, doi:[10.1016/j.ccr.2014.02.001](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.001).
- [110] Hildebrandt, N.; Wegner, K.D.; Algar, W.R. Luminescent Terbium Complexes: Superior Förster Resonance Energy Transfer Donors for Flexible and Sensitive Multiplexed Biosensing. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *273–274*, 125–138, doi:[10.1016/j.ccr.2014.01.020](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.020).
- [111] Binnemans, K. Lanthanide-Based Luminescent Hybrid Materials. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4283–4374, doi:[10.1021/cr8003983](https://doi.org/10.1021/cr8003983).
- [112] Hildebrandt, N.; Spillmann, C.M.; Algar, W.R.; Pons, T.; Stewart, M.H.; Oh, E.; Susumu, K.; Díaz, S.A.; Delehanty, J.B.; Medintz, I.L. Energy Transfer with Semiconductor Quantum Dot Bioconjugates: A Versatile Platform for Biosensing, Energy Harvesting, and Other Developing Applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 536–711, doi:[10.1021/acs.chemrev.6b00030](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00030).

- [113] Wang, F.; Liu, X. Recent Advances in the Chemistry of Lanthanide-Doped Upconversion Nanocrystals. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 976, doi:[10.1039/b809132n](https://doi.org/10.1039/b809132n).
- [114] Zhang, J.; Heinz, N.; Dolg, M. Understanding Lanthanoid(III) Hydration Structure and Kinetics by Insights from Energies and Wave Functions. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 7700–7708, doi:[10.1021/ic500991x](https://doi.org/10.1021/ic500991x).
- [115] Pearson, R.G. Hard and Soft Acids and Bases, HSAB, Part 1: Fundamental Principles. *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 581, doi:[10.1021/ed045p581](https://doi.org/10.1021/ed045p581).
- [116] Zabiszak, M.; Frymark, J.; Ogawa, K.; Skrobańska, M.; Nowak, M.; Jastrzab, R.; Kaczmarek, M.T. Complexes of β -Lactam Antibiotics and Their Schiff-Base Derivatives as a Weapon in the Fight against Bacterial Resistance. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *493*, 215326, doi:[10.1016/j.ccr.2023.215326](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215326).
- [117] Hossain, M.S. Metal Complexes as Potential Antimicrobial Agent: A Review. *Am. J. Heterocycl. Chem.* **2018**, *4*, 1, doi:[10.11648/j.ajhc.20180401.11](https://doi.org/10.11648/j.ajhc.20180401.11).
- [118] Pandey, A.; Boros, E. Coordination Complexes to Combat Bacterial Infections: Recent Developments, Current Directions and Future Opportunities. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 7340–7350, doi:[10.1002/chem.202004822](https://doi.org/10.1002/chem.202004822).
- [119] Chouhan, N.; Hait, M.; Roymahapatra, G.; Huang, M.; Xu, B.B.; Guo, Z. Complexation of Antibiotics with Transition Metal Ions: A Review. *ES Food Agrofor.* **2022**, doi:[10.30919/esfaf665](https://doi.org/10.30919/esfaf665).
- [120] Alekseev, V.G. Metal Complexes of Penicillins and Cephalosporins (Review). *Pharm. Chem. J.* **2012**, *45*, 679–697, doi:[10.1007/s11094-012-0703-6](https://doi.org/10.1007/s11094-012-0703-6).
- [121] Hrioua, A.; Loudiki, A.; Farahi, A.; Laghrib, F.; Bakasse, M.; Lahrich, S.; Saqrane, S.; El Mhammedi, M.A. Complexation of Amoxicillin by Transition Metals: Physico-Chemical and Antibacterial Activity Evaluation. *Bioelectrochemistry* **2021**, *142*, 107936, doi:[10.1016/j.bioelechem.2021.107936](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107936).
- [122] Foti, C.; Giuffrè, O. Interaction of Ampicillin and Amoxicillin with Mn^{2+} : A Speciation Study in Aqueous Solution. *Molecules* **2020**, *25*, 3110, doi:[10.3390/molecules25143110](https://doi.org/10.3390/molecules25143110).
- [123] Anacona, J.R. Synthesis and antibacterial activity of some metal complexes of beta-lactamic antibiotics. *J. Coord. Chem.* **2001**, *54*, 355–365, doi:[10.1080/00958970108022648](https://doi.org/10.1080/00958970108022648).

- [124] Fernández-González, A.; Badía, R.; Díaz-García, M.E. Insights into the Reaction of β -Lactam Antibiotics with Copper(II) Ions in Aqueous and Micellar Media: Kinetic and Spectrometric Studies. *Anal. Biochem.* **2005**, *341*, 113–121, doi:[10.1016/j.ab.2005.02.021](https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.02.021).
- [125] Orabi, A.S. Physicochemical Properties of Ampicillin and Amoxicillin as Biologically Active Ligands with Some Alkali Earth, Transition Metal, and Lanthanide Ions in Aqueous and Mixed Solvents at 20, 30, and 40°C. *J. Solution. Chem.* **2005**, *34*, 95–111, doi:[10.1007/s10953-005-2075-y](https://doi.org/10.1007/s10953-005-2075-y).
- [126] Giuffrè, O.; Angowska, S.; Foti, C.; Sammartano, S. Thermodynamic Study on the Interaction of Ampicillin and Amoxicillin with Ca^{2+} in Aqueous Solution at Different Ionic Strengths and Temperatures. *J. Chem. Eng. Data* **2019**, *64*, 800–809, doi:[10.1021/acs.jced.8b01081](https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b01081).
- [127] Cardiano, P.; Cigala, R.M.; Crea, F.; De Stefano, C.; Giuffrè, O.; Sammartano, S.; Vianelli, G. Potentiometric, UV and ^1H NMR Study on the Interaction of Penicillin Derivatives with Zn(II) in Aqueous Solution. *Biophys. Chem.* **2017**, *223*, 1–10, doi:[10.1016/j.bpc.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.01.002).
- [128] Refat, M.S.; Al-Maydama, H.M.A.; Al-Azab, F.M.; Amin, R.R.; Jamil, Y.M.S. Synthesis, Thermal and Spectroscopic Behaviors of Metal–Drug Complexes: La(III) , Ce(III) , Sm(III) and Y(III) Amoxicillin Trihydrate Antibiotic Drug Complexes. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *128*, 427–446, doi:[10.1016/j.saa.2014.02.160](https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.160).
- [129] Cigala, R.M.; Crea, F.; De Stefano, C.; Sammartano, S.; Vianelli, G. Thermodynamic Parameters for the Interaction of Amoxicillin and Ampicillin with Magnesium in NaCl Aqueous Solution, at Different Ionic Strengths and Temperatures. *J. Chem. Eng. Data* **2017**, *62*, 1018–1027, doi:[10.1021/acs.jced.6b00849](https://doi.org/10.1021/acs.jced.6b00849).
- [130] Zhuravlev, E.V.; Alekseev, V.G.; Feofanova, M.A.; Ryasenskii, S.S. Complexation of Cu(II) with Cefotaxime in NaCl Solution. *Russ. J. Inorg. Chem.* **2016**, *61*, 877–879, doi:[10.1134/S0036023616070214](https://doi.org/10.1134/S0036023616070214).
- [131] Alekseev, V.G.; Nikiforova, A.A.; Markelova, S.V. Reaction of Cefalexine with Manganese(II), Cobalt(II), Nickel(II), Zinc(II), and Cadmium(II) Ions. *Russ. J. Gen. Chem.* **2006**, *76*, 1468–1470, doi:[10.1134/S1070363206090192](https://doi.org/10.1134/S1070363206090192).

- [132] Auda, S.H.; Mrestani, Y.; Fetouh, M.I.; Neubert, R.H.H. ChemInform Abstract: Characterization and Activity of Cephalosporin Metal Complexes. *ChemInform* **2008**, *39*, chin.200844245, doi:[10.1002/chin.200844245](https://doi.org/10.1002/chin.200844245).
- [133] Anacona, J.R.; Patiño, C. Metalloantibiotics: Synthesis and Antibacterial Activity of Ceftazidime Metal Complexes. *J. Coord. Chem.* **2009**, *62*, 613–621, doi:[10.1080/00958970802291480](https://doi.org/10.1080/00958970802291480).
- [134] Waters, J.E.; Stevens-Cullinane, L.; Siebenmann, L.; Hess, J. Recent Advances in the Development of Metal Complexes as Antibacterial Agents with Metal-Specific Modes of Action. *Curr. Opin. Microbiol.* **2023**, *75*, 102347, doi:[10.1016/j.mib.2023.102347](https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102347).
- [135] Al-Khodir, F.A.I.; Refat, M.S. Physicochemical, Spectroscopic, and Anti-Tumor Studies of Cefradine Complexes with Ca(II), Zn(II), Fe(III), Au(III), and Pd(II) Ions. *Russ. J. Gen. Chem.* **2017**, *87*, 1087–1092, doi:[10.1134/S1070363217050322](https://doi.org/10.1134/S1070363217050322).
- [136] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of Equilibria in Solution. Determination of Equilibrium Constants with the HYPERQUAD Suite of Programs. *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753, doi:[10.1016/0039-9140\(96\)01958-3](https://doi.org/10.1016/0039-9140(96)01958-3).
- [137] Irving, H.M.; Miles, M.G.; Pettit, L.D. A Study of Some Problems in Determining the Stoichiometric Proton Dissociation Constants of Complexes by Potentiometric Titrations Using a Glass Electrode. *Anal. Chim. Acta* **1967**, *38*, 475–488, doi:[10.1016/S0003-2670\(01\)80616-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80616-4).
- [138] Buck, R.P.; Rondinini, S.; Covington, A.K.; Baucke, F.G.K.; Brett, C.M.A.; Camoes, M.F.; Milton, M.J.T.; Mussini, T.; Naumann, R.; Pratt, K.W.; et al. Measurement of pH. Definition, Standards, and Procedures (IUPAC Recommendations 2002). *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 2169–2200, doi:[10.1351/pac200274112169](https://doi.org/10.1351/pac200274112169).
- [139] Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. Hyperquad Simulation and Speciation (HySS): A Utility Program for the Investigation of Equilibria Involving Soluble and Partially Soluble Species. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311–318, doi:[10.1016/S0010-8545\(98\)00260-4](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00260-4).
- [140] Lever, A.B.P. *Inorganic Electronic Spectroscopy*, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **1984**; ISBN 978-0-444-42389-4.

- [141] Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*, 1st ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, **2008**; ISBN 978-0-471-74339-2.
- [142] Garribba, E.; Micera, G. The Determination of the Geometry of Cu(II) Complexes: An EPR Spectroscopy Experiment. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 1229, doi:[10.1021/ed083p1229](https://doi.org/10.1021/ed083p1229).
- [143] Kelly, S.M.; Jess, T.J.; Price, N.C. How to Study Proteins by Circular Dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom.* **2005**, *1751*, 119–139, doi:[10.1016/j.bbapap.2005.06.005](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005).
- [144] Berova, N., Polavarapu, P.L., Nakanishi, K., Woody, R.W. *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy: Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products, and Biomolecules*; Eds.; 1st ed.; Wiley, 2012; ISBN 978-1-118-01292-5.

7. Przedruk publikacji składających się na cykl artykułów rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami

- A1** **Frymark, J.*;** Zabiszak, M.; Grajewski, J.; Tylkowski, B.; Jastrząb, R. Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 7605.
<https://doi.org/10.3390/ijms26157605>
[IF =4,900, MNiSW = 140]
- A2** **Frymark, J.*;** Zabiszak, M.; Ogawa, K.; Jastrząb, R. Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin. *J. Mol. Liq.* **2026**, *444*, 129190.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.129190>
[IF =6,000, MNiSW = 100]
- A3** **Frymark, J.*;** Zabiszak, M.; Kaczmarek, M. T.; Jastrząb, R. Metal–Antibiotic Interactions: Potentiometric and Spectroscopic Investigation of Cloxacillin and Dicloxacillin Complexes in Aqueous Solution. *Sci. Rep.* **2026**.
<https://doi.org/10.1038/s41598-026-55267-5>
[IF =3,900, MNiSW = 140]

- A1** **Frymark, J.*;** Zabiszak, M.; Grajewski, J.; Tylkowski, B.; Jastrzab, R.
Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and
Spectroscopic Studies.
Int. J. Mol. Sci. **2025**, *26*, 7605.
<https://doi.org/10.3390/ijms26157605>
[IF =4,900, MNiSW = 140]



Article

Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies

Justyna Frymark ^{1,*} , Michał Zabiszak ¹ , Jakub Grajewski ¹ , Bartosz Tylkowski ^{2,3} and Renata Jastrzab ¹

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznan, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznan, Poland; zabiszakm@amu.edu.pl (M.Z.); jakub.grajewski@amu.edu.pl (J.G.); renatad@amu.edu.pl (R.J.)

² Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, Unitat de Tecnologia Química, Marcellí Domingo 2, 43007 Tarragona, Spain; bartosz.tylkowski@eurecat.org

³ Department of Clinical Neuropsychology, Faculty of Health Science, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, ul. Skłodowskiej Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: justyna.frymark@amu.edu.pl

Abstract

Metal ions, including Mg(II), Ca(II), Sr(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Nd(III), Eu(III), and Tb(III), were investigated in binary systems alongside ampicillin at molar ratios of 1:1 and 1:2. These investigations were carried out in aqueous solutions, and the formation of complexes was verified through meticulous computational analysis. Detailed stability constants for the formed complexes and equilibrium constants for the involved reactions were meticulously determined. Furthermore, a comprehensive examination of the impact of ligand concentration on the configuration of the central metal atom's coordination sphere was conducted. This investigation was complemented by spectroscopic measurements, which effectively confirmed the observed changes in the coordination sphere of the metal ions.

Keywords: metal ion complexes; ampicillin; complex compounds; spectroscopy; potentiometric measurements



Academic Editor: Paolo Proposito

Received: 19 June 2025

Revised: 1 August 2025

Accepted: 4 August 2025

Published: 6 August 2025

Citation: Frymark, J.; Zabiszak, M.; Grajewski, J.; Tylkowski, B.; Jastrzab, R. Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 7605. <https://doi.org/10.3390/ijms26157605>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ampicillin (Amp) (Figure 1), (2S,5R,6R)-6-[(2R)-2-amino-2-phenylacetyl]amino)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0]heptane-2-carboxylic acid, is a β -lactam antibiotic belonging to the group of aminopenicillins, derivatives of penicillin, and has been widely recognized for its efficacy in the treatment of bacterial infections [1–6]. The effect of this antibiotic is to combat bacterial infections by inhibiting the production of bacterial cell walls, leading to their disintegration. Its mechanism involves blocking bacterial cell wall synthesis by binding to penicillin-binding proteins, which ultimately compromises the structure of the bacterial cell wall and leads to cell lysis [7,8]. Ampicillin, a semisynthetic derivative of penicillin, is a cornerstone in the arsenal of antibiotics because of its broad-spectrum activity against a wide range of bacterial pathogens. It is often recommended for respiratory and urinary tract infections, specific forms of meningitis, and similar diseases [5,9–11]. Adherence to the prescribed dose and completion of the duration of treatment are crucial to maximize effectiveness and decrease the development of potential antibiotic resistance [12–16].

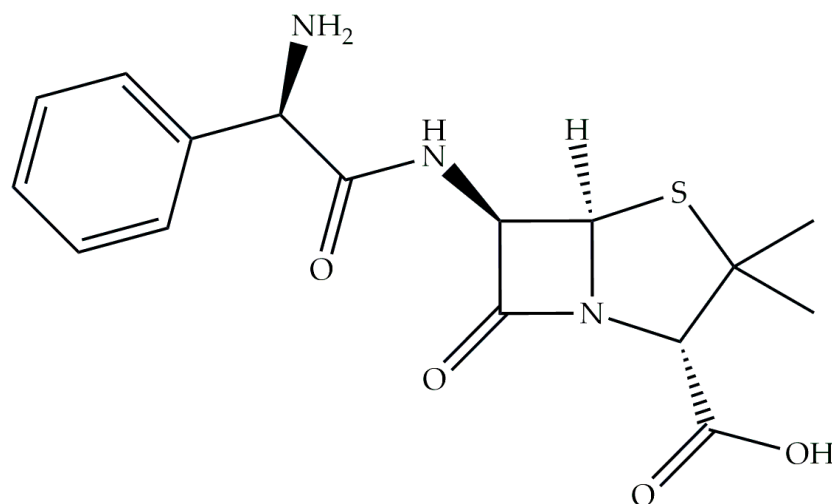


Figure 1. Formula of ampicillin.

However, despite its early effectiveness, extensive utilization and incorrect use of ampicillin have resulted in increased antimicrobial resistance, which presents a notable concern for public health on a global scale [17–21]. Bacteria have devised various strategies to overcome the impact of antibiotics. Among these is the creation of β -lactamase enzymes that break down the β -lactam ring of ampicillin, making it incapable of effectively fighting bacterial infections. These advances underscore the importance of judicious antibiotic use and the exploration of substitute therapies for microbial infections [22–26].

In addition to the challenge of antimicrobial resistance, recent research has focused on exploring the complex interactions of ampicillin with metal ions. Metal ions play a diverse role in biological systems, influencing enzyme activity, redox reactions, and cellular processes. Furthermore, the coordination of ampicillin with metal ions can affect its pharmacological properties by altering its stability, bioavailability, and antimicrobial activity [27–32].

The study of the interactions between ampicillin and metal ions may be crucial in pharmacology, providing valuable information on how this antibiotic behaves in living organisms or in the environment. Investigating the impact of metal ions on the effectiveness of ampicillin could lead to new approaches to improve its efficacy and address resistance mechanisms, ultimately significantly advancing antibiotic treatment options [33–36]. We selected s-block (Mg(II), Ca(II), Sr(II)) and d-block (Co(II), Ni(II), Cu(II)) ions that are both essential in human physiology and commonly encountered in environmental matrices. The f-block lanthanides (Nd(III), Eu(III), Tb(III)) were chosen due to their growing use in luminescent probes and theranostic applications.

In this paper, we present the results of potentiometric and spectroscopic studies on complex formation in systems involving ampicillin and selected metal ions. By gaining insight into molecular-level interactions and exploring the structural and functional characteristics of complexes formed between ampicillin and metal ions, we aim to improve our understanding of antibiotic mechanisms and lay the groundwork for the advancement of new antimicrobial treatments for addressing AMR while improving antibiotic therapy.

2. Results and Discussion

This research involved the examination of binary systems comprising ampicillin and metal ions using potentiometric titration and spectroscopy methods. The first stage of this experiment was to determine successive protonation constants for ampicillin, which were found to be $\log \beta = 7.06$ for H(Amp) and $\log \beta = 9.61$ for the form H₂(Amp) ($pK_{a1} = 2.55$; $pK_{a2} = 7.06$). Literature pK_a values for ampicillin are 2.54 and 7.30 [27,31];

however, our values differ due to the use of a different temperature and ionic strength ($I = 0.10 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$). Analysis of these values of ampicillin protonation constants revealed deprotonation of the carboxyl group at relatively low pH values, followed by deprotonation of the amino group at pH values above 5.0 (Figure 2). Subsequently, the obtained values of the protonation constant of ampicillin and the hydrolysis constant of metal ions previously determined were used as a set of data for theoretical computations [36–39].

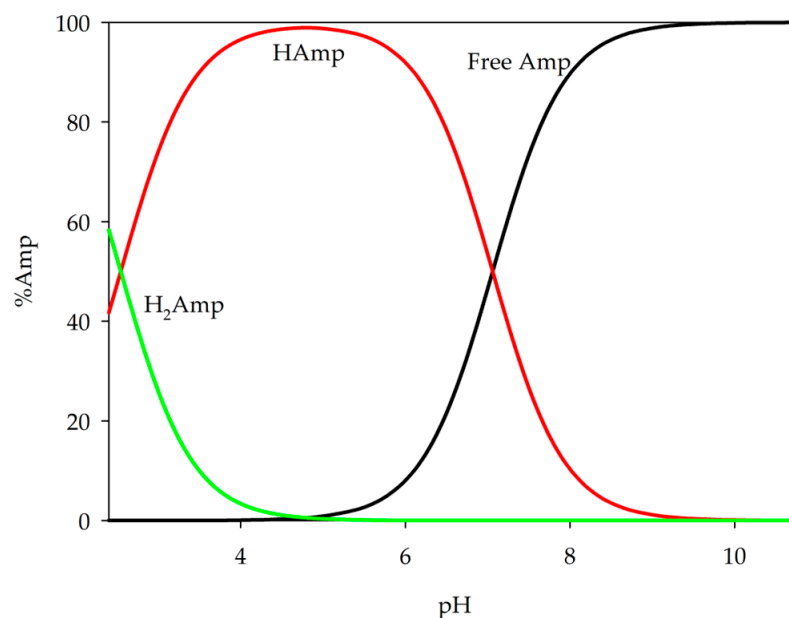


Figure 2. Distribution diagram of ampicillin.

2.1. Equilibrium Study of S-Block Elements

A series of equimolar titrations and a two-fold excess of ampicillin were performed. Then, on the basis of the data obtained, the overall stability constants ($\log\beta$) of the complexes formed in the system and the equilibrium constants of the formation of the complex ($\log K_e$) were determined, as shown in Table 1.

Table 1. The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with ampicillin and s-block elements (standard deviations are given in parentheses).

	Species	Mg(II)		Ca(II)		Sr(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HAmp)	9.85(5)	2.75	10.00(2)	2.90	9.99(1)	2.89
	M(Amp)	3.60(2)	3.60	-	-	2.60(7)	2.60
	M(Amp)(OH)	-	-	-	-	-8.56(5)	2.60
1:2	M(HAmp)	-	-	10.00(2)	2.90	9.99(1)	2.89
	M(HAmp)(HAmp)	20.91(4)	6.72	-	-	-	-
	M(HAmp)(Amp)	14.23(5)	7.13	-	-	-	-
	M(Amp) ₂	6.96(4)	3.36	-	-	-	-

The distribution diagrams of the complex forms were plotted using the obtained stability constant values (Figure 3). In the equimolar system, only a small amount of the ions participate in the complexation process and form complexes with one molecule of ampicillin in the inner coordination sphere. At a low pH value, when the complexation process begins and the ampicillin molecule becomes partially deprotonated, the M(HAmp) form is observed as the only form in each of the tested systems for the s-block elements.

For the system with magnesium ions, as the pH increases within the range of 7.0 to 9.8, the $\text{Mg}(\text{Amp})$ complex becomes dominant and binds over 60% of the magnesium ions.

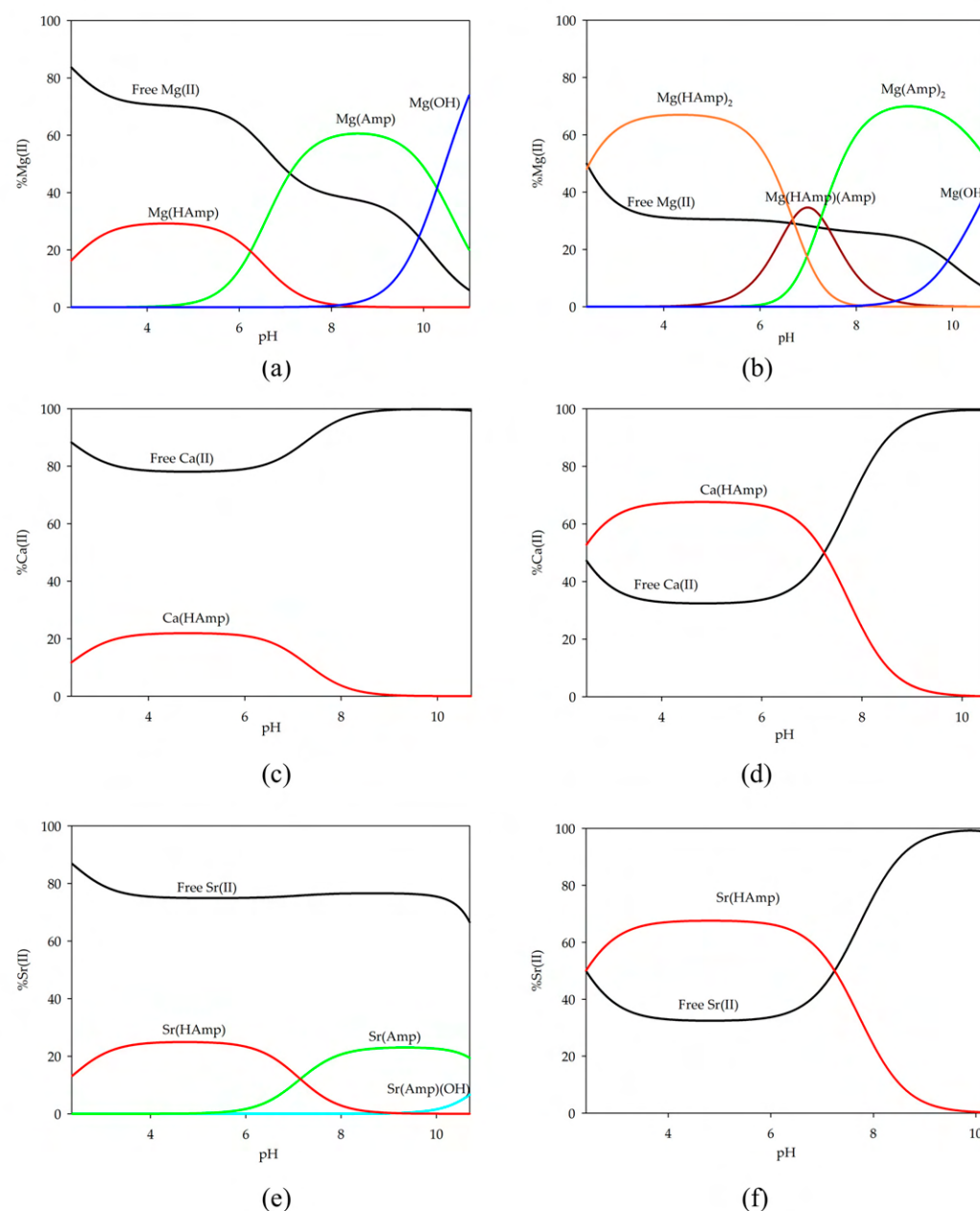


Figure 3. Distribution diagrams for the systems studied: (a) $\text{Mg}(\text{II})$ /ampicillin (1:1 ratio); (b) $\text{Mg}(\text{II})$ /ampicillin (1:2 ratio); (c) $\text{Ca}(\text{II})$ /ampicillin (1:1 ratio); (d) $\text{Ca}(\text{II})$ /ampicillin (1:2 ratio); (e) $\text{Sr}(\text{II})$ /ampicillin (1:1 ratio); (f) $\text{Sr}(\text{II})$ /ampicillin (1:2 ratio).

In a ligand-excess system involving magnesium ions, various forms with two molecules of ampicillin were observed. Initially, both molecules are partially deprotonated; then, within a narrow pH range (6.7–7.2), fully and partially deprotonated molecular forms dominate until pH 7.2, where $\text{Mg}(\text{Amp})_2$ becomes dominant up to pH 10.7.

In the case of calcium ions, the $\text{Ca}(\text{HAmp})$ form is the sole species present in both the equimolar system and the two-fold excess of ampicillin. In the equimolar system, this form binds only 20% of the ions, whereas, with an excess of ampicillin, 65% of the studied ligand participates in metal coordination. A similar situation is observed for strontium ions, where the same proportion of ions engage in complexation processes. However, in the equimolar system, a complex with a fully deprotonated ligand was also observed

for strontium ions, although only approximately 20% of the metal ions participated in coordination. In addition, the formation of a hydroxy complex was observed in this system.

2.2. Equilibrium Study of D-Block Elements

For d-block metal ions (Co(II), Ni(II), Cu(II)), a series of potentiometric titrations were performed, and the overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) were calculated (Table 2). Distribution diagrams were plotted as illustrated in Figure 4. In the case of equilibrium studies with d-block metal ions, the presence of a larger number of various complex forms in the systems can be observed. In the equimolar systems, only complexes with one coordinated ampicillin molecule were observed, while an excess of antibiotic led to forms with two ampicillin molecules in the inner coordination sphere of the metal ion. Notable differences compared to systems with s-block ions include the presence of a greater number of complexes and a higher percentage of ion participation in the complexation process.

Table 2. The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with ampicillin and d-block elements (standard deviations are given in parentheses).

	Species	Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
		logβ	logK _e	logβ	logK _e	logβ	logK _e
1:1	M(HAmp)	9.99(6)	2.90	10.91(2)	3.82	10.36(4)	3.26
	M(Amp)	3.12(6)	3.12	3.86(1)	3.86	5.23(5)	5.23
	M(Amp)(OH)	-	-	-6.21(1)	3.70	0.29(2)	8.83
	M(Amp)(OH) ₂	-14.88(8)	12.66	-	-	-7.48(3)	5.99
	M(Amp)(OH) ₃	-25.33(4)	3.32	-	-	-18.67(4)	2.58
1:2	M(HAmp)(HAmp)	20.49(4)	6.30	19.99(3)	5.80	20.54(2)	6.35
	M(HAmp)(Amp)	13.96(4)	6.86	13.60(3)	6.50	15.75(4)	8.66
	M(Amp) ₂	6.22(5)	3.10	6.27(2)	2.41	10.89(2)	5.65
	M(Amp) ₂ (OH)	-	-	-	-	4.06(2)	6.95
	M(Amp) ₂ (OH) ₂	-11.84(3)	9.47	-	-	-3.85(2)	5.85

In the equimolar system, the complex with a partially deprotonated form of ampicillin occurs at lower pH values. For cobalt(II) ions, the M(HAmp) form binds about 40% of the ions; for nickel(II) ions, it is the dominant form and binds over 60% of the ions, while for copper(II), it binds about 44%. As the pH value increases, the predominant form in the system becomes the M(Amp) form. At higher pH values, hydroxyl complexes begin to form M(Amp)(OH)_x, where x = 1–3. In the systems with cobalt and nickel ions, they are not dominant due to the dominance of metal hydroxides. However, for the copper(II) ion system, the dominant is M(Amp)(OH)₂ binding about 90% of the present ions.

In systems with an excess of ampicillin, forms with two ligand molecules coordinated to the inner coordination sphere were identified. Similarly to what was observed in magnesium-complexed ampicillin systems at lower pH values, complexation begins with the formation of a complex with a two-molecule incompletely deprotonated ligand, which binds approximately half of the available metal ions. At around pH 7.0, when the fully deprotonated ligand is present in the system, the M(HAmp)(Amp) complex obtains the maximum concentration.

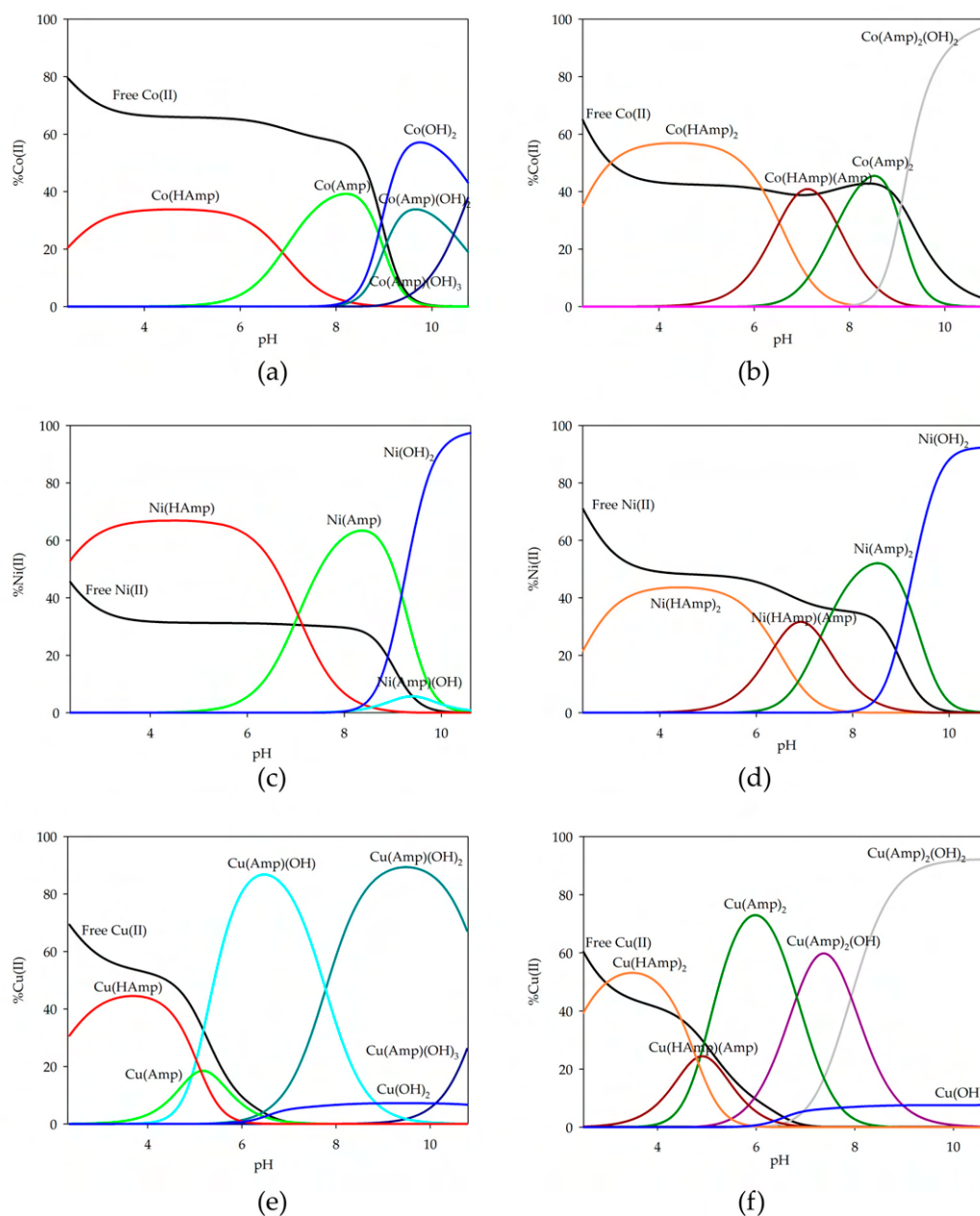


Figure 4. Distribution diagrams for the systems studied: (a) Co(II)/ampicillin (1:1 ratio); (b) Co(II)/ampicillin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/ampicillin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/ampicillin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/ampicillin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/ampicillin (1:2 ratio).

It should be noted that for both copper-based systems, ligand deprotonation occurs at lower pH values, causing the $\text{Cu}(\text{HAmp})(\text{Amp})$ species to dominate at lower pH compared to other metals. The dominant form in the systems and reaching its maximum concentration at pH around 7.0 is the $\text{Cu}(\text{Amp})_2$ form. At pH above 8.0, for copper and cobalt systems, dihydroxyl complexes appear, binding almost 90% of the ions present in the solution. However, under the same conditions for the system with nickel ions, the dominant form is hydroxide.

2.3. Equilibrium Study of F-Block Elements

The complexation process for f-block metals was also examined. The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes are presented in Table 3, and the distribution diagrams are shown in Figure 5.

Table 3. The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with ampicillin and f-block elements (standard deviations are given in parentheses).

	Species	Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HAmp)	10.82(2)	3.72	10.76(4)	3.66	10.45(2)	3.18
	M(Amp)	3.42(2)	3.42	-	-	-	-
	M(Amp)(OH) ₃	-	-	-21.11(4)	20.20	-21.06(1)	20.24
	M ₂ (Amp)	-	-	7.47(3)	7.47	-	-
1:2	M(HAmp)	10.82(2)	3.72	10.76(4)	3.66	10.45(2)	3.35
	M(Amp)	3.42(2)	3.42	-	-	-	-
	M(HAmp)(Amp)	-	-	13.45(5)	13.45	-	-
	M(Amp) ₂	-	-	6.50(6)	6.50	-	-
	M(Amp)(OH) ₃	-	-	-	-	-21.06(1)	20.24
	M(Amp) ₂ (OH) ₃	-	-	-16.81(5)	4.22	-	-
	M(Amp) ₂ (OH) ₄	-	-	-26.77(4)	3.81	-	-

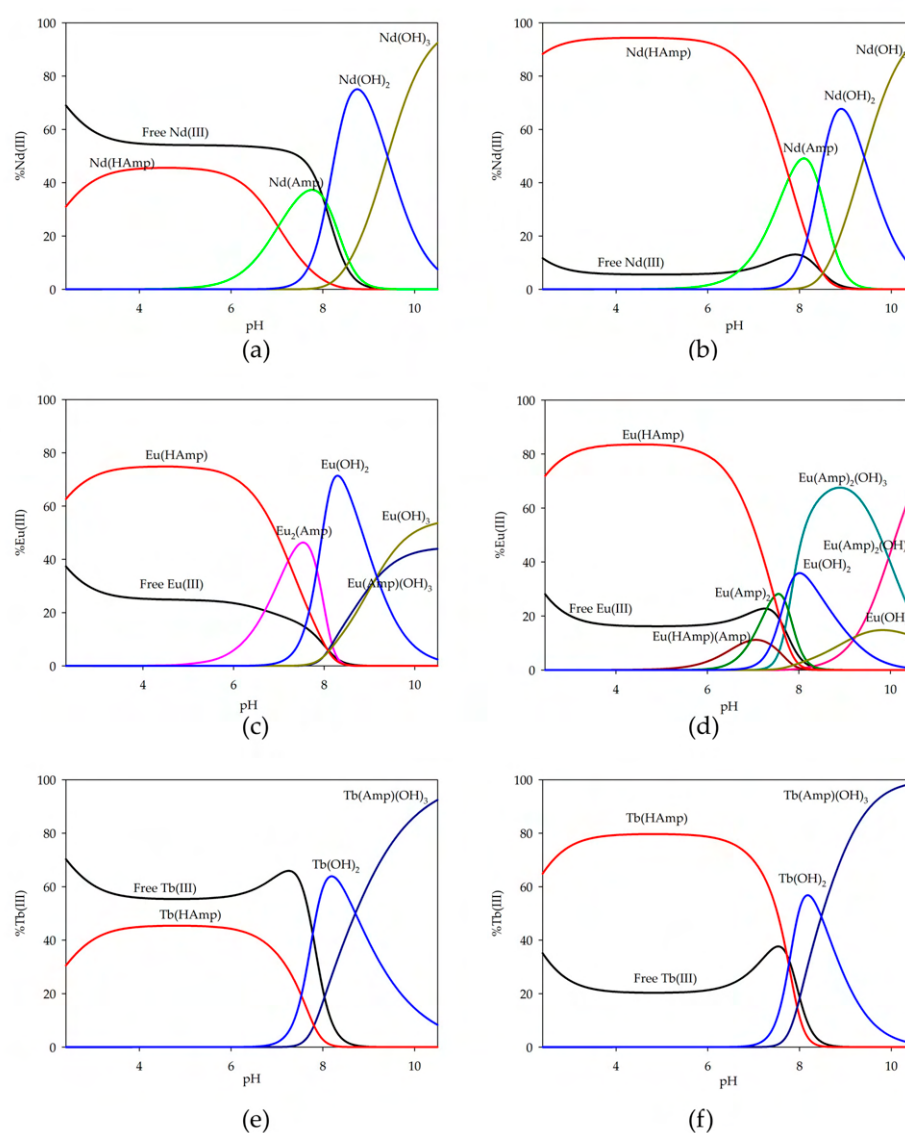


Figure 5. Distribution diagrams for the systems studied: (a) Nd(III)/ampicillin (1:1 ratio); (b) Nd(III)/ampicillin (1:2 ratio); (c) Eu(III)/ampicillin (1:1 ratio); (d) Eu(III)/ampicillin (1:2 ratio); (e) Tb(III)/ampicillin (1:1 ratio); (f) Tb(III)/ampicillin (1:2 ratio).

In f-block metal ion systems, a different coordination method for europium ions is observed. In equimolar systems with neodymium ions, there is a partially deprotonated ampicillin form that binds about 40% of metal ions. As the pH increases, only the Nd(Amp) form occurs. However, neither of these forms dominates the system. Above pH 8.0, only neodymium hydroxides occur. Similar forms are present in excess ampicillin systems, with the notable difference being the significant quantitative participation of neodymium ions in the complexation process. The Nd(HAmp) form binds over 90% of the ions in solution, and the Nd(Amp) form binds approximately 60%. Subsequently, as seen in equimolar systems, hydroxides are predominant.

In equimolar systems with europium ions, the initial form to appear is similar to that of the neodymium system. Subsequently, the next form that occurs involves two europium ions coordinated to a single ampicillin molecule. This particular form reaches its peak concentration at around pH 7.3. Following this, there are formations of europium hydroxides and a hydroxy complex; however, these do not dominate within the system. However, in systems with excess ampicillin, there is a wider range of forms of complex compounds. At lower pH values, Eu(HAmp) initially appears, which binds about 80% of the europium ions. Then, due to the deprotonation of ampicillin and the involvement of another molecule in the coordination species containing two ampicillin molecules, a high pH level above 8.0 is reached in the case of hydroxyl complexes and the corresponding europium hydroxides, while these also formed, but without domination, as observed in other systems.

In both systems, terbium ions exist in the same forms but with varying degrees of involvement in the complexation process. In an equimolar system, around 50% of terbium ions bind to the initial Tb(HAmp) form, while this increases to about 80% in a system with a two-fold excess. Subsequently, terbium hydroxide is formed, and from pH 9.0 onwards, the predominant form present in solution is the hydroxy complex Tb(Amp)(OH)₃, and almost 100% of the metal ions are involved in coordination at pH 11.0.

All spectroscopic measurements (UV–Vis, FTIR, EPR, CD, luminescence) were performed in solution under conditions where multiple species are known to coexist in equilibrium, as determined by potentiometric titrations. The formation of coordination compounds in systems containing metal ions was confirmed by spectroscopic techniques. These measurements were carried out at selected pH values, based on speciation diagrams, to ensure the highest possible proportion of the desired complex form in solution.

2.4. UV–Vis Spectroscopy

d-electron elements, such as cobalt(II), nickel(II), and copper(II), are characterized by the presence of electrons in the d subshell. Electron transitions within this subshell (e.g., d-d transitions) cause absorption of radiation in the visible and ultraviolet range. These transitions are often well defined and lead to characteristic absorption bands in ultraviolet-visible (UV–Vis) spectra. The confirmation of the coordination of the transition metal ions studied with ampicillin is provided by the characteristic shifts and changes in the absorption spectra. The observed changes are shown in Figure 6, and the spectroscopic parameters of the systems studied are placed in Table 4. Due to the solubility limits of the studied systems, the absorbance values remained below 0.1 AU in several cases. As a result, the molar absorptivity coefficients reported in Table 4 should be considered as approximate values. Changes in absorbance are interpreted cautiously and serve as qualitative indicators of coordination changes, supported by complementary data (e.g., EPR, FTIR).

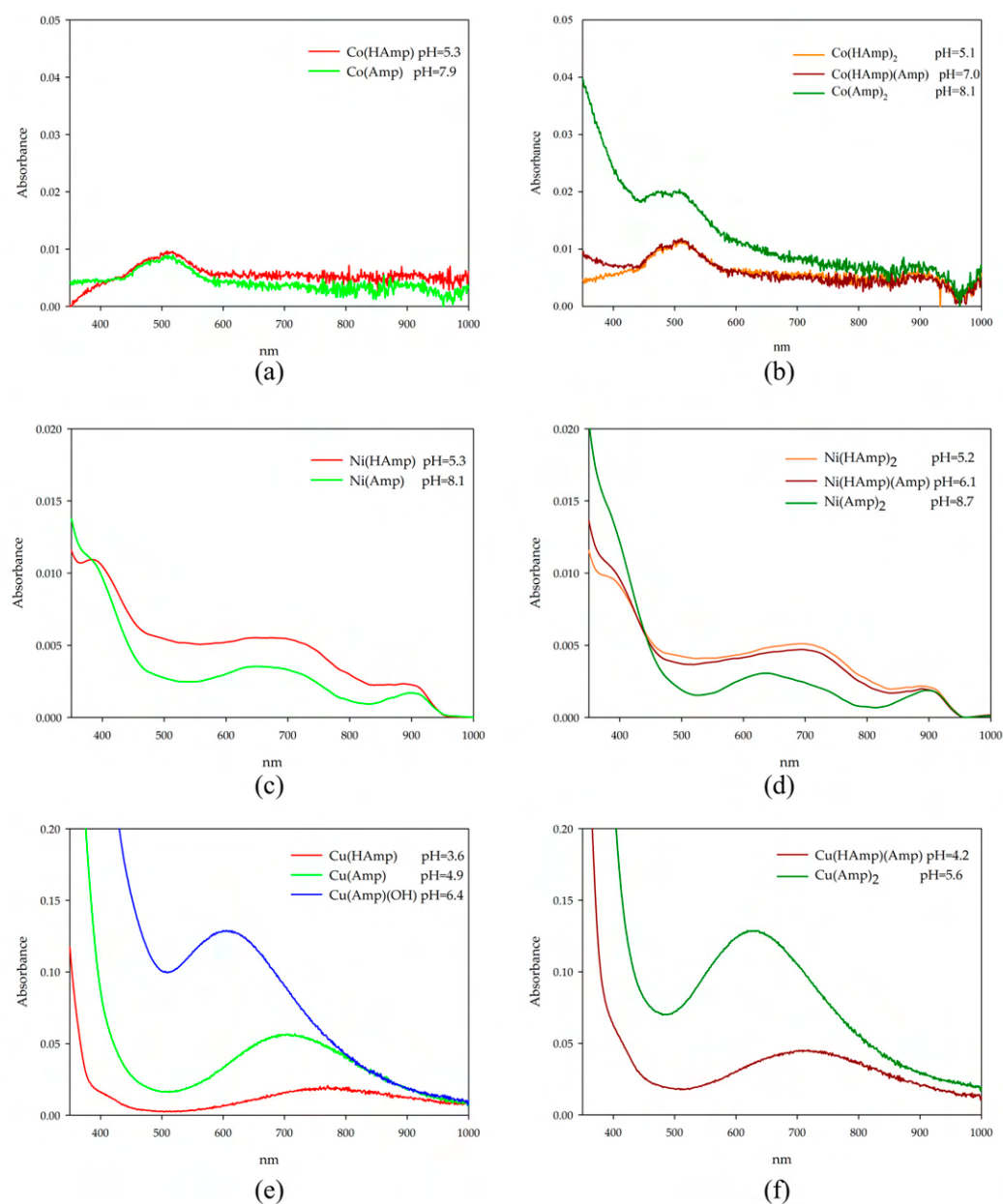


Figure 6. UV–Vis absorption spectra of (a) Co(II)/ampicillin (1:1 ratio); (b) Co(II)/ampicillin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/ampicillin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/ampicillin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/ampicillin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/ampicillin (1:2 ratio).

In systems with cobalt ions, the d-d parameters suggest a similar coordination in the equimolar and two-fold excess of ligand systems. To account for the presence of uncomplexed Co^{2+} in the UV–Vis spectra of metal–ligand systems, the spectrum of free Co^{2+} (recorded under identical conditions) was subtracted from the mixture spectrum. The subtraction was qualitative and did not involve scaling by molar absorptivity or estimated proportions, but speciation data were considered during the interpretation to identify the dominant absorbing species. In this case of the CoL and CoL_2 complex, a slight shift towards higher wavelengths was observed, indicating a change in the metal ions' internal coordination sphere. For hydroxy complexes, spectral recording was impossible due to precipitate formation. Although identical concentrations were used in potentiometric studies, the dynamic potentiometric cell conditions (slow titrant dosing, continuous stirring, inert atmosphere) prevented visible $\text{M}(\text{OH})_2$ precipitation that was encountered in static cuvette measurements. For nickel-ion complexes, slight shifts toward longer wavelengths

were observed along with a decrease in the molar absorption coefficient for the maximum wavelength as pH increased. In copper ion systems, the absorbance shifted toward lower wavelengths, and there was an increase in the molar absorption coefficient for the maximum wavelength as the pH increased. UV–Vis measurements at higher pH values were not performed due to precipitate formation. These results overall imply changes in the internal coordination sphere of the metal ion with increasing pH.

Table 4. Spectral parameters of binary complexes formed in systems of d-electron metal ions with ampicillin.

Species			pH	A	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ (dm ³ .mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
1:1	Co(II)	M(HAmp)	5.3	0.0096	517	9.6
		M(Amp)	7.9	0.0084	510	8.4
	Ni(II)	M(HAmp)	5.3	0.0056	670	5.6
				0.0023	905	2.3
		M(Amp)	8.1	0.0036	675	3.6
				0.0016	900	1.6
	Cu(II)	M(HAmp)	3.6	0.018	775	18
		M(Amp)	4.9	0.055	710	55
		M(Amp)(OH)	6.4	0.13	610	130
	1:2	Co(II)	M(HAmp)(HAmp)	5.1	0.012	510
M(HAmp)(Amp)			7.0	0.011	510	11
M(Amp) ₂			8.1	0.020	490	20
Ni(II)		M(HAmp)(HAmp)	5.2	0.0052	700	5.2
				0.0022	890	2.2
		M(HAmp)(Amp)	6.1	0.0045	710	4.5
				0.0021	894	2.1
		M(Amp) ₂	8.7	0.0031	644	3.1
				0.0019	900	1.9
Cu(II)		M(HAmp)(Amp)	4.2	0.044	725	44
		M(Amp) ₂	5.6	0.13	630	130

2.5. EPR Spectroscopy

EPR measurements confirmed that only monomorphous forms occurred in systems with copper(II) ions. At low pH values, characteristic spectra for copper ions were observed (Figure 7). In the equimolar system, the form of Cu(HAmp) indicates coordination of the oxygen atom from partially deprotonated ampicillin. However, in the system with a twofold excess of ampicillin, Cu(HAmp)₂ is formed at low pH and also indicates coordination by oxygen atoms. As the pH increases, there is an observable shift toward higher g_{II} values in the EPR spectra, indicating a change in the coordination environment around the copper (II) ions. The spectrum of the Cu(II)-Amp system at pH 4.0 (Figure 7b) indicates the presence of multiple species in equilibrium, as evidenced by more than four hyperfine lines in the parallel region. The g_{||} and A_{||} values reported correspond to the most intense signal components. Although the coordination mode is tentatively assigned to involve oxygen donor atoms based on the position of these parameters in the Peisach–Blumberg diagram [40].

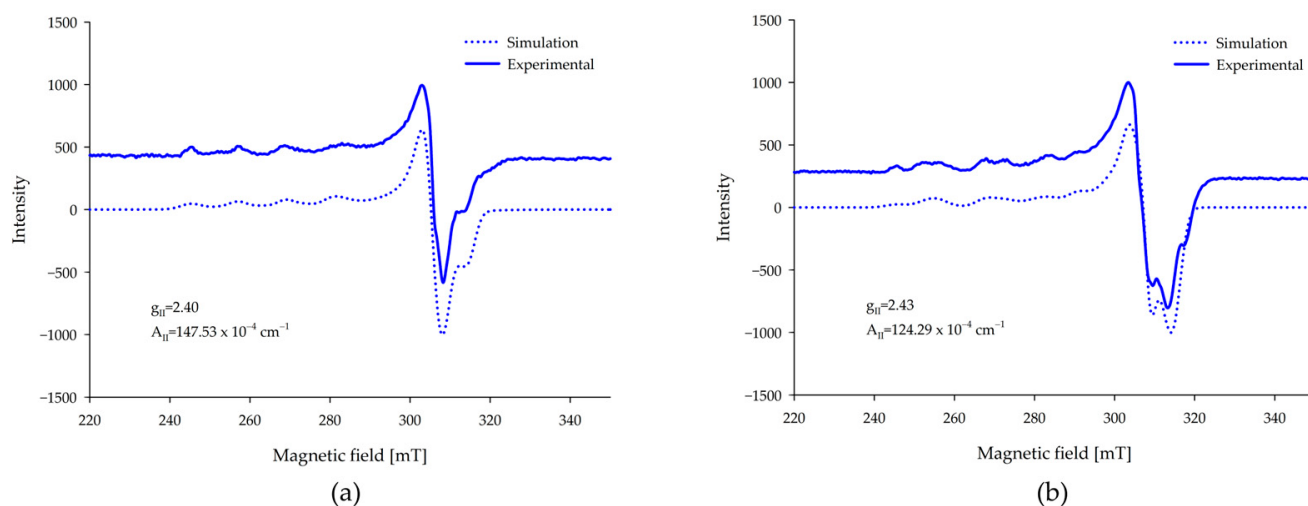


Figure 7. Experimental and simulated EPR spectra of (a) Cu(HAmp); (b) Cu(HAmp)₂.

2.6. Luminescence Spectroscopy

Drawing on the fundamental concepts and applications of lanthanide luminescence [41,42], emission spectra were measured for ampicillin binary systems with europium(III) ions and terbium(III) ions at the pH of the dominant complex forms (Figure 8). For europium(III) ion complexes with higher pH values, no emission measurements were carried out due to the formation of europium(III) hydroxide precipitate. When europium(III) ions were excited, emissions from the 5D_0 state to 7F_j ($j = 1, 2, 3, 4$) levels and from the 5D_1 state to the 7F_2 level were observed. The emission band was quenched for formed complexes, while a two-fold increase in emission of the 5D_0 - 7F_2 band was observed for the Eu₂(Amp) complex. Additionally, when a two-fold excess of ampicillin was used in one system, narrower emission bands were observed from the excited nondegenerate state.

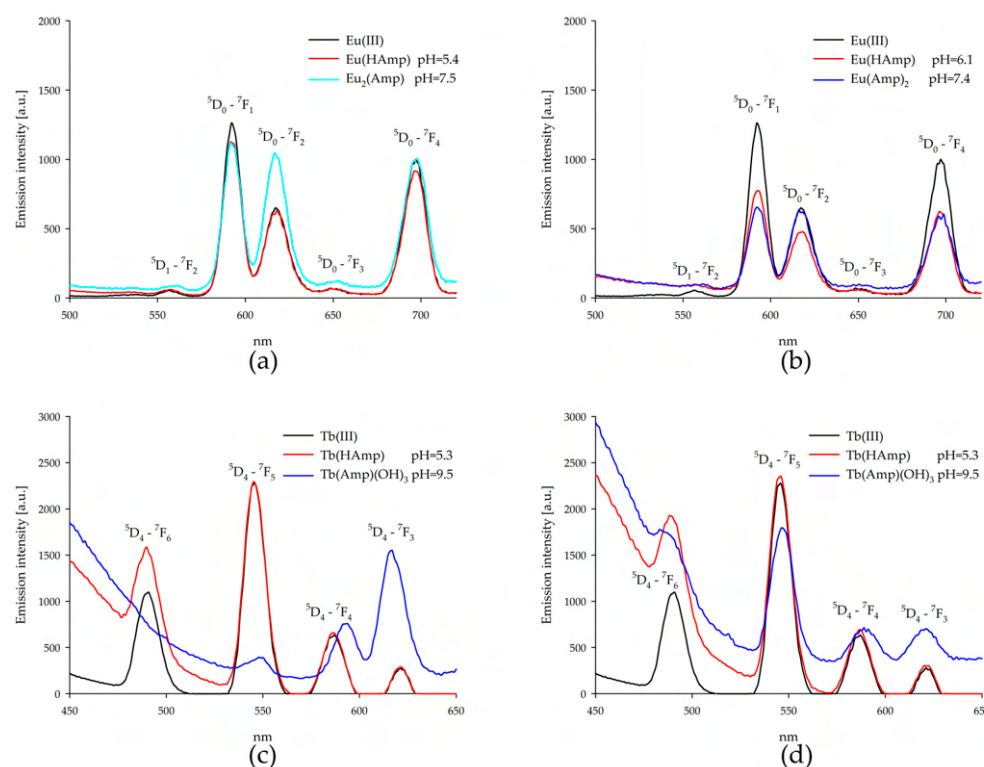


Figure 8. Emission spectra of the systems: (a) Eu(III)/ampicillin (1:1 ratio); (b) Eu(III)/ampicillin (1:2 ratio); (c) Tb(III)/ampicillin (1:1 ratio); (d) Tb(III)/ampicillin (1:2 ratio).

Excitation of terbium(III) ions resulted in emission from the excited nondegenerate state 5D_4 to the energy level of 7F_j ($j = 3, 4, 5, 6$) of the ground state. The observed bands showed an increase in intensity and band shifts for complexes with a partially deprotonated ampicillin molecule, $Tb(HAmp)$, and the equimolar system of the hydroxy complex $(Tb(Amp)(OH)_3)$. Furthermore, there was a sharp decrease in the intensity of the 5D_4 – 7F_5 band. In cases with excess ampicillin, this band was also extinguished, but to a lesser extent, while showing only a small increase in intensity. The baseline rise at high pH likely reflects light scattering by incipient $Tb(OH)_3$ precipitate, observed as faint turbidity. Emission intensities should thus be treated qualitatively.

2.7. IR Spectroscopy

Infrared spectra of the metal complexes with ampicillin confirm the involvement of the oxygen and nitrogen donor atoms in coordination. Spectra were recorded for dominant complexes and compared to free ampicillin and free metal ions under the same pH conditions (Figure 9). FTIR spectra were recorded for complex solutions prepared in D_2O . To suppress background signals from the solvent, the instrument was calibrated using pure D_2O as the reference background prior to each measurement. The observed changes in the intensity of the bands and their shifts suggest participation in the coordination of the carboxyl group, the carbonyl group of the amide, and the β -lactam ring, as well as the amine groups. Participation in the coordination of the carboxyl group is evidenced, among other things, by band differences in the 1390 cm^{-1} region for complexes compared to free ampicillin. This band corresponds to the symmetric stretching vibration ($\nu_s\text{ COO}^-$) of the carboxylate group, which is known to occur in this region in aqueous solution environments [43,44]. In addition, confirmation of coordination through the donor oxygen atoms is provided by changes in the characteristic bands near 1685 cm^{-1} , 1766 cm^{-1} , and 3383 cm^{-1} , which correspond, respectively, to coordination through the carbonyl group of the amide, the carbonyl group of the β -lactam ring, and the hydroxyl group (from the carbonyl group). The confirmation of the formation of coordination bonds with the central atom of the amino groups is provided by the changes found for the deformation vibrations of the amino groups ($N-H$, $\sim 1505\text{ cm}^{-1}$) and the stretching vibrations ($\sim 3383\text{ cm}^{-1}$).

IR spectra of ampicillin (Figure S1) and all IR spectra for equimolar systems (Figure S2) and those with a two-fold excess of ampicillin (Figure S3) are included in the Supplementary Materials.

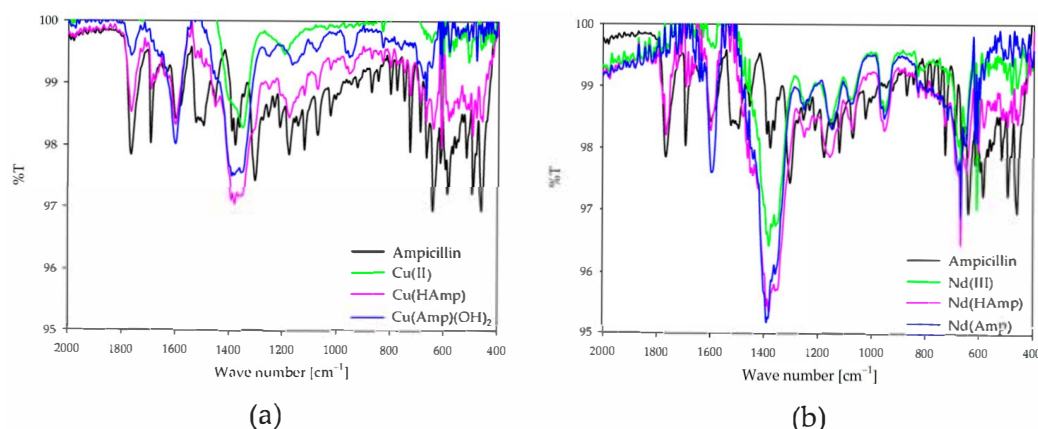


Figure 9. Cont.

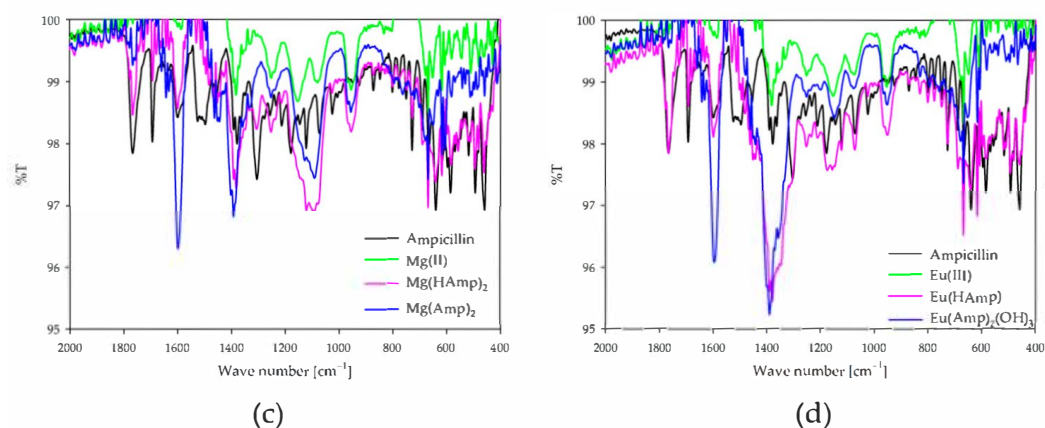


Figure 9. IR spectra of (a) Cu(II)/ampicillin (1:1 ratio); (b) Nd(II)/ampicillin (1:1 ratio); (c) Mg(II)/ampicillin (1:2 ratio); (d) Eu(II)/ampicillin (1:2 ratio).

2.8. CD Spectroscopy

To determine the conformational preferences of ampicillin complexes, circular dichroism (CD) spectra analysis was initiated by measuring the CD spectra of ampicillin at different pH levels. This approach was intended to distinguish the changes related to pH from those associated with interactions with metal cations when analyzing the CD spectra of ampicillin complexes. The CD spectra of ampicillin in water, measured at the same concentrations as the complex spectra, exhibit a long-wavelength Cotton effect ($\Delta\epsilon$) 14.8 at 235 nm, and two additional Cotton effects, $\Delta\epsilon = -14.1$ at 205 nm and $\Delta\epsilon = 67.7$ at 187 nm, at pH 3.0. At an alkaline pH 9.0, these effects are $\Delta\epsilon = 12.0$ at 235 nm, $\Delta\epsilon = -9.3$ at 207 nm, and $\Delta\epsilon = 54.5$ at 188 nm (Figure 10a). Thus, with increasing pH, a decrease of approximately 20% in the Cotton effects is observed, with no significant changes in their positions, indicating that the antibiotic's conformation remains unchanged regardless of pH. The CD spectra of the ampicillin complexes were recorded at pH values previously determined by potentiometric titration. In all cases, the measurements were conducted for both equimolar complexes and those with a twofold excess of the antibiotic (Tables 5–7).

Table 5. Values of Cotton effects for the systems with ampicillin and s-block elements.

Metal/Ampicillin (1:1 Ratio)						Metal/Ampicillin (1:2 Ratio)					
Mg(II)		Ca(II)		Sr(II)		Mg(II)		Ca(II)		Sr(II)	
pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)
4.3	13.7 (233) −12.1 (207) 64.8 (187)	5.0	12.0 (233) −11.3 (206) 59.5 (187)	5.0	12.5 (232) −12.2 (207) 59.6 (187)	4.5	25.6 (233) −23.5 (208) 126.7 (187)	5.0	26.4 (233) −23.8 (207) 127.0 (187)	5.0	25.0 (233) −23.1 (207) 125.5 (187)
8.8	11.3 (234) −8.9 (206) 49.7 (188)			9.0	11.8 (233) −7.6 (206) 46.0 (189)	7.0	25.1 (234) −19.6 (207) 115 (187)				
						9.0	24.1 (233) −15.3 (207) 102.1 (188)				

Table 6. Values of Cotton effects for the systems with ampicillin and d-block elements.

Metal/Ampicillin (1:1 Ratio)						Metal/Ampicillin (1:2 Ratio)					
Co(II)		Ni(II)		Cu(II)		Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)	pH	$\Delta\epsilon$ (nm)
5.1	15.2 (233) −13.0 (207) 71.4 (187)	4.5	15.7 (233) −15.0 (207) 77.6 (187)	3.5	6.5 (242) −9.2 (204) 42.0 (187)	5.0	26.8 (233) −23.7 (207) 126.1 (187)	4.4	27.0 (233) −21.0 (206) 128.2 (187)	4.2	19.2 (235) −22.7 (205) 102.7 (187)
8.0	12.3 (233) −8.7 (207) 54.4 (188)	8.3	15.5 (233) −7.3 (207) 57.2 (188)	5.0	5.1 (242) −7.5 (203) 27.3 (187)	7.1	23.8 (233) −19.3 (206) 112.4 (188)	6.8	25.7 (232) −19.4 (206) 118.3 (187)	6.0	6.9 (232) −8.8 (209) 44.3 (189)

Table 6. Cont.

Metal/Ampicillin (1:1 Ratio)						Metal/Ampicillin (1:2 Ratio)					
Co(II)		Ni(II)		Cu(II)		Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)
9.8	9.4 (233)			6.3	3.0 (294)	8.5	19.0 (233)	8.2	23.7 (233)	7.3	6.6 (305)
	−5.0 (207)				−2.3 (238)		−11.3 (207)		−14.1 (207)		7.0 (232)
	48.3 (188)				−3.1 (220)		88.7 (188)		98.7 (188)		−13.3 (210)
10.5	8.2 (233)			9.2	2.6 (301)	10.0	17.9 (233)			9.2	6.2 (314)
	−3.4 (207)				2.6 (260)		−7.7 (208)				2.2 (234)
	44.0 (189)				−6.5 (221)		84.1 (189)				−15.7 (210)
					−7.0 (210)						30.9 (186)
					−5.5 (200)						

Table 7. Values of Cotton effects for the systems with ampicillin and f-block elements.

Metal/Ampicillin (1:1 Ratio)						Metal/Ampicillin (1:2 Ratio)					
Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)		Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)	pH	$\Delta \epsilon$ (nm)
5.0	10.8 (236)	5.0	13.3 (236)	5.0	15.9 (236)	5.0	25.8 (235)	2.4	23.3 (232)	5.0	28.4 (235)
	−9.8 (204)		−13.5 (207)		−14.0 (206)		−24.8 (206)		−27.9 (206)		−26.0 (206)
	57.1 (187)		74.3 (187)		80.2 (187)		131.6 (187)		123.3 (187)		137.3 (188)
7.7	10.7 (235)	7.5	13.5 (235)	9.2	13.8 (236)	8.1	22.9 (235)	5.0	26.7 (233)	9.2	24.7 (235)
	−8.4 (205)		−10.6 (205)		−11.1 (206)		−17.0 (207)		−23.1 (206)		−19.3 (206)
	48.6 (187)		66.4 (187)		60.4 (188)		104.0 (188)		127.1 (187)		108.7 (189)
		10.0	11.9 (236)					7.4	23.9 (235)		
			−8.8 (206)						−19.2 (207)		
			54.9 (188)						112.9 (188)		
								9.0	22.9 (234)		
									−16.2 (207)		
									101.4 (188)		
								10.0	20.9 (235)		
									−15.7 (207)		
									91.2 (189)		

Al-Khodir's group synthesized Amp complexes with iron(III), palladium(II), and gold(III) [45]. In the complexes with iron(III) and gold(III), coordination occurs through the amide carbonyl group, the β -lactam carbonyl group, the amino group, and the carboxylate group of Amp. In contrast, the palladium(II) complex is coordinated via the β -lactam carbonyl group and the carboxylate group. The Abbas group synthesized Schiff bases of Amp with acetylacetone, along with their complexes containing cobalt(II), nickel(II), copper(II), europium(III), and gadolinium(III) [46]. In these complexes, coordination occurs through the amide nitrogen atom, the β -lactam carbonyl group, and the amino group. The spatial structure of the studied compounds appears to be similar to that obtained by Abbas, which explains the results observed during circular dichroism (CD) measurements. Due to the relatively high rigidity of the ampicillin structure, the CD spectra of its complexes do not undergo significant changes. An example can be the CD spectra recorded over a wide pH range for cobalt complexes with ampicillin in a 1:1 molar ratio (Figure 10b).

When the pH changes, the amino group undergoes protonation in acidic conditions, while the carboxyl group ionizes in alkaline conditions. The aromatic chromophore is positioned away from the complexation sites, and its orientation relative to the rest of the molecule remains largely unchanged with pH variations.

The only deviation from the general trend is observed in the CD spectra of copper complexes. In the case of the Cu-Amp 1:1 complex under alkaline conditions, there is a reversal of the long-wavelength Cotton effect and a disappearance of the short-wavelength effect located around 188 nm (Figure 10c). Interestingly, in the system with a twofold excess of ampicillin, these effects are reduced by approximately half, suggesting that the second molecule does not participate in complexation in the same manner as the first molecule

(Figure 10d). The changes observed in the CD spectra for copper complexes are reflected in the distribution diagrams. For alkaline solutions, a significant presence of Cu-antibiotic complexes is still observed, while, compared to other systems, the amount of metal in the form of hydroxide is relatively low.

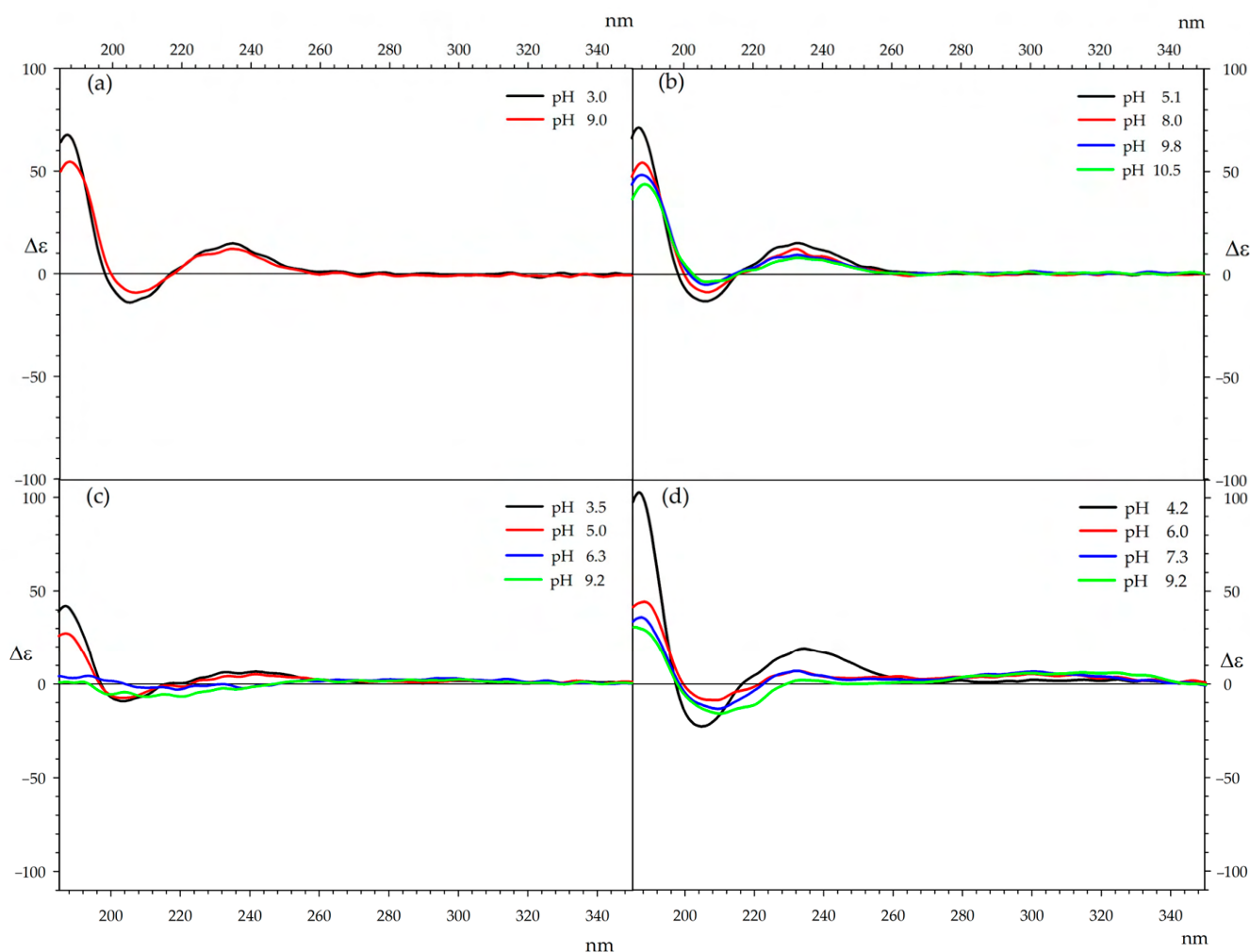


Figure 10. CD spectra of (a) ampicillin; (b) Co(II)/ampicillin (1:1 ratio); (c) Cu(II)/ampicillin (1:1 ratio); (d) Cu(II)/ampicillin (1:2 ratio).

All CD spectra for equimolar systems (Figure S4) and those with a two-fold excess of ampicillin (Figure S5) are included in the Supplementary Materials.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Metal nitrates ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) (>99% purity) and used as supplied. Ampicillin, anhydrous basis (96.0–102.0%) obtained from Merck (Darmstadt, Germany), was used without further purification.

3.2. Equilibrium Studies

The equilibrium studies were obtained by potentiometric measurements, which were performed using a Titrand 905 Metrohm equipped with an autoburette with an electrode Metrohm 6.0233.100 (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). This equipment was calibrated in terms of hydrogen ion concentration prior to each series of titrations [37–39,47–49].

Before each series of measurements, the glass electrode (Metrohm AG, Herisau, Switzerland) was calibrated daily using two standard buffer solutions of pH 4.00 and pH 9.00, and the water ionization constant ($pK_w = 13.77$ at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) was determined in situ by titrating acidified KNO_3 solutions. The conditions under which the measurements were taken were constant and clearly defined: temperature $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, constant ionic strength of $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (KNO_3), neutral gas atmosphere (helium—Ultra High Purity 5.0; Linde Gaz, Krakow, Poland), and a CO_2 -free NaOH titrant. Titrations used 30 mL samples and burette increments of 0.004 mL of base at a concentration of approximately $0.2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Furthermore, the concentration of metal ions was $0.001\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, and the metal:ligand ratio was 1:1 and 1:2 in binary systems.

Calculations were performed using the HYPERQUAD 2008 program (Hyperquad Limited, Leeds, UK) to determine the overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes. On the basis of the calculations obtained from the program, models of the formation of complexes in the studied systems were proposed. To verify the precision of the assumed model, the Hamilton test and the chi-squared test [47–49] were used to examine the standard deviation values, and the experimental curve converged with the model. Additionally, the following equilibria were evaluated as stability constants of $oM + pL + qH \rightleftharpoons MoLpHq$ (where M = metal ion, L = ligand), and calculated using the following equation:

$$\beta = \frac{M_o L_p H_q}{[M]^o [L]^p [H]^q} \quad (1)$$

The hydrolysis constants of the metal ions were included in the computer analysis of the potentiometric data. These constants were taken from our previous article, and their values were the ionic product of water was $pK_w = 13.77$ [38,39,47,48]. The HySS (Hyperquad Simulation and Speciation) program was used to generate distribution diagrams of particular forms [37].

3.3. UV–Vis Spectroscopy

The UV–Vis absorption spectra were collected at room temperature using Evolution 300 UV–Vis ThermoFisher Scientific equipment (Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, WI, USA) with a xenon lamp and a Plastibrand PMMA cell (Brand, Wertheim, Germany) with a path length of 1 cm. Measurements covered wavelengths ranging from 340 to 1000 nm, while the concentration of metal ions was maintained at $0.001\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, with metal-to-ligand molar ratios of 1:1 and 1:2. Measurements were performed at pH values selected based on speciation diagrams, corresponding to conditions under which the highest proportion of the metal ion is involved in complex formation.

3.4. EPR Spectroscopy

EPR measurements were carried out at X-band frequency ($\nu = 8.9\text{ GHz}$) and at a temperature of $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (the temperature of liquid nitrogen) using glass capillary tubes with a volume of $130\text{ }\mu\text{m}^3$, and the data were recorded on an SE/X 2457 Radiopan spectrometer (Radiopan, Poznan, Poland). This study focused on copper ion systems with a metal ion concentration of $0.005\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ in a water:glycol mixture (3:1), examining both 1:1 and 1:2 metal to ligand ratios. All experimental spectra were simulated using the EPRsim32

program (version 0.3 alpha, Kraków, Poland) [50]. Measurements were performed at pH values selected based on speciation diagrams, corresponding to conditions under which the highest proportion of the metal ion is involved in complex formation.

3.5. Luminescence Spectroscopy

The luminescence studies were recorded on an RF–6000 spectrofluorophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) using 5/5 nm slit widths. The concentration of metal ions was $0.001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. The samples for europium ions were excited at 395 nm, and those for terbium ions were excited at 370 nm. The absorbance of the solutions at the excitation wavelength was <0.2 absorbance units. The samples were prepared using ultra-high-quality deionized and purified water from a Simplicity Ultrapure Water System (Millipore, Darmstadt, Germany). Measurements were performed at pH values selected based on speciation diagrams, corresponding to conditions under which the highest proportion of the metal ion is involved in complex formation.

3.6. Infrared Spectroscopy (FT-IR)

Infrared studies were recorded on an FT-IR INVENIO R spectrophotometer (Bruker, Bremen, Germany). Samples were prepared by dissolving the relevant ligand species (ampicillin and appropriate metal nitrates) in D_2O . The metal concentration for the IR studies was $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, with metal:ligand molar ratios of 1:1 and 1:2; the concentration was higher to ensure sufficient absorbance in transmission. The pH values were adjusted by the addition of NaOD or DCl. The pH values were corrected according to the formula $\text{pD} = \text{pH}$ meter reading + 0.4 [49]. Measurements were performed at pH values selected based on speciation diagrams, corresponding to conditions under which the highest proportion of the metal ion is involved in complex formation.

3.7. CD Spectroscopy

The circular dichroism (CD) studies were recorded on the J810 spectropolarimeter (JASCO, Tokyo, Japan) in the range of 180–400 nm in water solutions. Spectra were recorded at ambient temperature and accumulated with 4 scans, both for free ampicillin and ampicillin complexes. The measurements were made in nitrogen gas (flow 10 L/min) with an optical path length of 0.5 mm. The concentrations of the metals in solutions were $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Measurements were performed at pH values selected based on speciation diagrams, corresponding to conditions under which the highest proportion of the metal ion is involved in complex formation.

4. Conclusions

The formation of binary complexes in binary systems of ampicillin with selected metal ions has been thoroughly investigated and established. In the equimolar system, the researchers found that only complex forms with one coordinated ampicillin molecule were present. However, in the case of a twofold excess of the antibiotics, all studied metals—except for Ca(II) and Sr(II), which remain as in equimolar system species—even at high ligand concentrations, form complexes, with two ligand molecules located in the coordination sphere. As the pH of the system increased, a progression was observed from protonated forms initially, followed by the formation of simple complexes, and finally hydroxy complexes. The complex formation and the inner coordination sphere were confirmed through the use of various spectroscopic methods, including infrared, UV-Vis, and luminescence measurements. The studies were conducted at different pH conditions to validate the changes in the internal coordination sphere caused by the attachment of subsequent functional groups to the central atom. Infrared spectroscopy studies confirmed the participation of the antibiotic functional groups in the formation of coordination bonds

with the selected metal ions. UV–Vis studies revealed changes in absorption and shifts in absorbance during the formation of complexes with the oxygen donor atom at lower pH values. Luminescence measurements showed a decrease in the emission of europium ions, while a shift and enhancement in the 5D_4 – 7F_5 band were observed for terbium ions. Furthermore, circular dichroism studies demonstrated the conformational stability of ampicillin throughout the entire studied range.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms26157605/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, J.F., M.Z. and R.J.; methodology, J.F., M.Z. and R.J.; validation, R.J. and M.Z.; formal analysis, J.F., M.Z., B.T. and J.G.; investigation, J.F. and J.G.; resources, R.J. and M.Z.; data curation, M.Z. and J.F.; writing—original draft preparation, J.F., M.Z., B.T. and J.G.; writing—review and editing, R.J., J.G., B.T. and J.F.; visualization, J.F.; supervision, M.Z. and R.J.; project administration, J.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information File).

Acknowledgments: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

Amp Ampicillin

References

1. Lima, L.M.; Silva, B.N.M.D.; Barbosa, G.; Barreiro, E.J. β -Lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *208*, 112829. [\[CrossRef\]](#)
2. Muteeb, G.; Rehman, M.T.; Shahwan, M.; Aatif, M. Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: A narrative review. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1615. [\[CrossRef\]](#)
3. Fernandes, R.; Amador, P.; Prudêncio, C. β -Lactams: Chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev. Med. Microbiol.* **2013**, *24*, 7–17. [\[CrossRef\]](#)
4. Bush, K. β -Lactam antibiotics. In *Antibiotic and Chemotherapy*, 9th ed.; Finch, R.G., Greenwood, D., Norrby, S.R., Whitley, R.J., Eds.; Elsevier: London, UK, 2010; pp. 200–225. [\[CrossRef\]](#)
5. Peechakara, B.V.; Basit, H.; Gupta, M. Ampicillin. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2024. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519569/> (accessed on 10 June 2025).
6. Kwan, K.C.; Rogers, J.D. Pharmacokinetics of β -Lactam Antibiotics. In *Antibiotics*; Demain, A.L., Solomon, N.A., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1983; pp. 247–370. [\[CrossRef\]](#)
7. Waxman, D.J.; Strominger, J.L. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 825–869. [\[CrossRef\]](#)
8. Kong, K.; Schneper, L.; Mathee, K. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* **2010**, *118*, 1–36. [\[CrossRef\]](#)
9. Shah, K.J.; Cherabuddi, K.; Shultz, J.; Borgert, S.; Ramphal, R.; Klinker, K.P. Ampicillin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE): A single-center university hospital experience. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *51*, 57–61. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

10. Bunnell, K.; Duong, A.; Ringsred, T.; Mian, A.; Bhathena, S. Aminopenicillins for treatment of ampicillin-resistant enterococcal urinary tract infections. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2022**, *79*, 1056–1065. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Suleyman, G.; Zervos, M.J. Safety and efficacy of commonly used antimicrobial agents in the treatment of enterococcal infections: A review. *Expert. Opin. Drug Saf.* **2016**, *15*, 153–167. [\[CrossRef\]](#)
12. Miller, W.R.; Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* **2014**, *12*, 1221–1236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Nadgir, C.A.; Biswas, D.A. Antibiotic resistance and its impact on disease management. *Cureus* **2023**, *15*, e38251. [\[CrossRef\]](#)
14. McEwen, S.A.; Collignon, P.J. Antimicrobial resistance: A One Health perspective. *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*, 2. [\[CrossRef\]](#)
15. Li, M.; Liu, Q.; Teng, Y.; Ou, L.; Xi, Y.; Chen, S.; Duan, G. The resistance mechanism of *Escherichia coli* induced by ampicillin in laboratory. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 2853–2863. [\[CrossRef\]](#)
16. Türkyılmaz, O.; Darcan, C. Resistance mechanism of *Escherichia coli* strains with different ampicillin resistance levels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2024**, *108*, 5. [\[CrossRef\]](#)
17. Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Aguilar, G.R.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. O'Neill, J. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*; HM Government and Wellcome Trust: London, UK, 2016.
19. Holmes, A.H.; Moore, L.S.; Sundsfjord, A.; Steinbakk, M.; Regmi, S.; Karkey, A.; Guerin, P.J.; Piddock, L.J. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet* **2016**, *387*, 176–187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. O'Leary, K. The global burden of antimicrobial resistance. *Nat. Med.* **2022**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Salam, A.; Al-Amin, Y.; Salam, M.T.; Pawar, J.S.; Akhter, N.; Rabaan, A.A.; Alqumber, M.A.A. Antimicrobial resistance: A growing serious threat for global public health. *Healthcare* **2023**, *11*, 1946. [\[CrossRef\]](#)
22. Mdarhri, H.A.; Benmessaoud, R.; Yacoubi, H.; Seffar, L.; Assimi, H.G.; Hamam, M.; Boussettine, R.; Filali-Ansari, N.; Lahlou, F.A.; Diawara, I.; et al. Alternatives therapeutic approaches to conventional antibiotics: Advantages, limitations and potential application in medicine. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1826. [\[CrossRef\]](#)
23. Martirosov, D.M.; Lodise, T.P. Emerging trends in epidemiology and management of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *85*, 266–275. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Mohd Sazilly Lim, S.; Sime, F.B.; Roberts, J.A. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: Current evidence on treatment options and the role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in dose optimisation. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2019**, *53*, 726–745. [\[CrossRef\]](#)
25. Singh, G.; Rana, A.; Smriti. Decoding antimicrobial resistance: Unraveling molecular mechanisms and targeted strategies. *Arch. Microbiol.* **2024**, *206*, 280. [\[CrossRef\]](#)
26. Gauba, A.; Rahman, K.M. Evaluation of antibiotic resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1590. [\[CrossRef\]](#)
27. Zabizsak, M.; Frymark, J.; Ogawa, K.; Skrobańska, M.; Nowak, M.; Jastrzab, R.; Kaczmarek, M.T. Complexes of β -lactam antibiotics and their Schiff-base derivatives as a weapon in the fight against bacterial resistance. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *493*, 215326. [\[CrossRef\]](#)
28. Alekseev, V.G. Metal complexes of penicillins and cephalosporins (Review). *Pharm. Chem. J.* **2012**, *45*, 679–697. [\[CrossRef\]](#)
29. Abd El Wahed, M.G.; Ayad, M. Stability constants of Cu^{2+} , $\text{Fe}^{3+} \mapsto \text{Zr}^{4+}$ chelates of ampicillin, dopamine and α -methyl L-dopa in aqueous medium. *Anal. Lett.* **1984**, *17*, 819–836. [\[CrossRef\]](#)
30. Alekseev, V.G.; Shcherbakova, E.E.; Yakubovich, Y.Y.; Vorob'ev, N.V.; Larin, S.V.; Shigina, O.Y. Interaction of ampicillin with Mn(II), Co(II), and Ni(II) ions. *Russ. J. Gen. Chem.* **2006**, *76*, 321–324. [\[CrossRef\]](#)
31. Moustakas, M. The role of metal ions in biology, biochemistry and medicine. *Materials* **2021**, *14*, 549. [\[CrossRef\]](#)
32. Frei, A. Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 2627–2639. [\[CrossRef\]](#)
33. Božić Cvijan, B.; Korać Jačić, J.; Bajčetić, M. The impact of copper ions on the activity of antibiotic drugs. *Molecules* **2023**, *28*, 5133. [\[CrossRef\]](#)
34. Pavlič, A.; Gobin, I.; Begić, G.; Tota, M.; Abram, M.; Špalj, S. The effect of nickel ions on the susceptibility of bacteria to ciprofloxacin and ampicillin. *Folia Microbiol.* **2022**, *67*, 649–657. [\[CrossRef\]](#)
35. Karaky, N.; Tang, S.; Ramalingam, P.; Kirby, A.; McBain, A.J.; Banks, C.E.; Whitehead, K.A. Multidrug-resistant *Escherichia coli* remains susceptible to metal ions and graphene-based compounds. *Antibiotics* **2024**, *13*, 381. [\[CrossRef\]](#)
36. Gawrońska, M.; Kowalik, M.; Makowski, M. Recent advances in medicinal chemistry of ampicillin: Derivatives, metal complexes, and sensing approaches. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2022**, *155*, 116691. [\[CrossRef\]](#)
37. Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): A utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311–318. [\[CrossRef\]](#)

38. Zabiszak, M.; Frymark, J.; Grajewski, J.; Jastrzab, R. Spectroscopic studies of lanthanide(III) complexes with L-malic acid in binary systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 9210. [[CrossRef](#)]
39. Zabiszak, M.; Frymark, J.; Nowak, M.; Grajewski, J.; Stachowiak, K.; Kaczmarek, M.T.; Jastrzab, R. Influence of d-electron divalent metal ions in complex formation with L-tartaric and L-malic acids. *Molecules* **2021**, *26*, 5290. [[CrossRef](#)]
40. Peisach, J.; Blumberg, W.E. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691–708. [[CrossRef](#)]
41. Eliseeva, S.V.; Bünzli, J.-C.G. Lanthanide Luminescence for Functional Materials and Bio-Sciences. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 189–227. [[CrossRef](#)]
42. Bünzli, J.-C.G. Lanthanide Luminescence: From Fundamental Concepts to Photonic Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2729–2755. [[CrossRef](#)]
43. McAfee, L.L. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry; Part B: Application in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry. *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*, 1122–1124. [[CrossRef](#)]
44. Baraldi, C.; Tinti, A.; Ottani, S.; Gamberini, M.C. Characterization of polymorphic ampicillin forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *100*, 329–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Al-Khodir, F.A.I.; Refat, M.S. Spectroscopic elaboration and structural characterizations of new Fe(III), Pd(II), and Au(III) ampicillin complexes: Metal-antibiotic ligational behaviors. *J. Pharm. Innov.* **2015**, *10*, 335–347. [[CrossRef](#)]
46. Abbas, A.M.; Faisal, S.R.; Orabi, A.S. Novel β -lactam antibiotic derivative and its complexes: DFT, frontier energy levels, DNA interaction, docking, physicochemical and antimicrobial properties. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1218*, 128487. [[CrossRef](#)]
47. Frymark, J.; Zabiszak, M.; Grajewski, J.; Hnatejko, Z.; Kołodyska, D.; Kaczmarek, M.T.; Jastrzab, R. Excess of polyamine as a factor influencing the mode of coordination in the Eu(III)/ α -hydroxy acid/spermine system. *Polyhedron* **2022**, *221*, 115853. [[CrossRef](#)]
48. Zabiszak, M.; Nowak, M.; Gabryel, M.; Ogawa, K.; Kaczmarek, M.T.; Hnatejko, Z.; Jastrzab, R. New coordination compounds of citric acid and polyamines with lanthanide ions—Potential application in monitoring the treatment of cancer diseases. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *198*, 110715. [[CrossRef](#)]
49. Glasoe, P.K.; Long, F.A. Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 188–190. [[CrossRef](#)]
50. Spalek, T.; Pietrzyk, P.; Sojka, Z. Application of the Genetic Algorithm Joint with the Powell Method to Nonlinear Least-Squares Fitting of Powder EPR Spectra. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 18–29. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

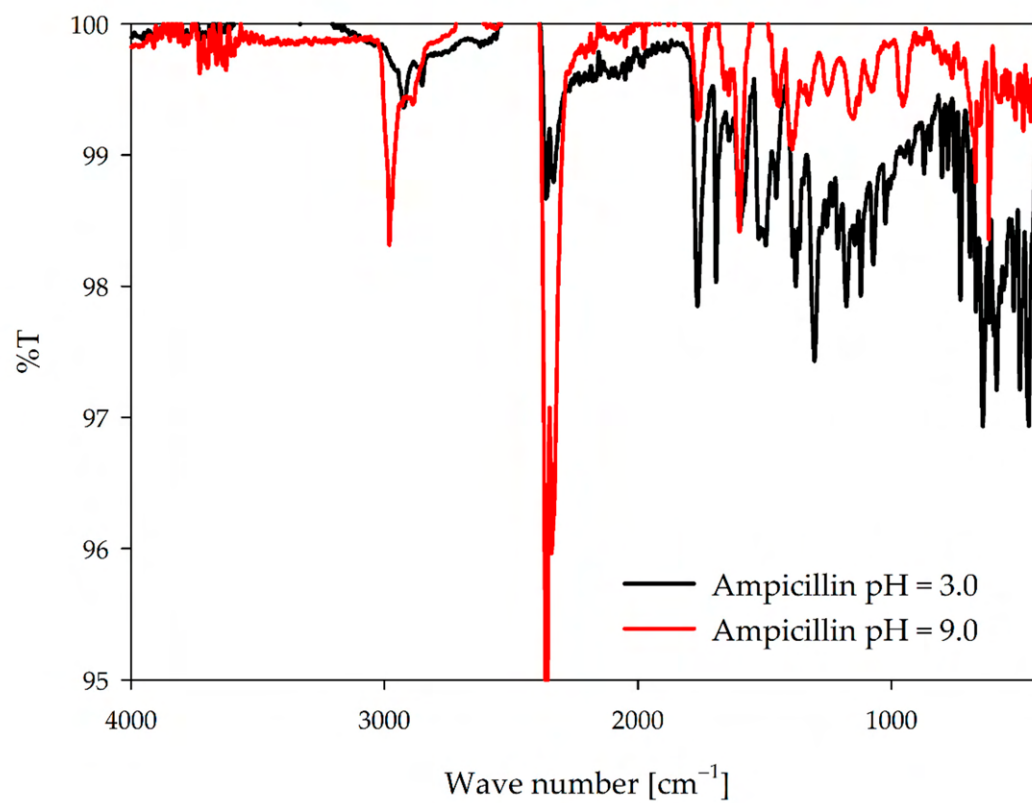
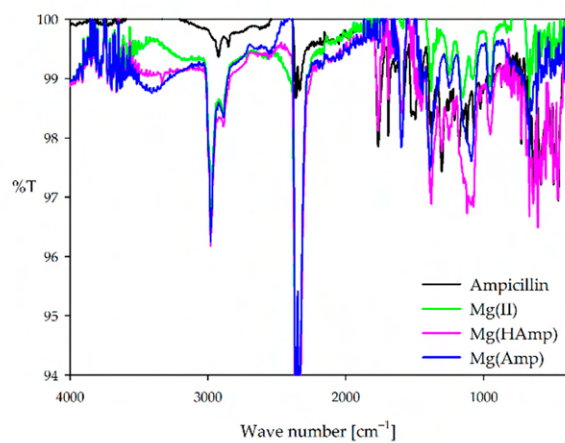
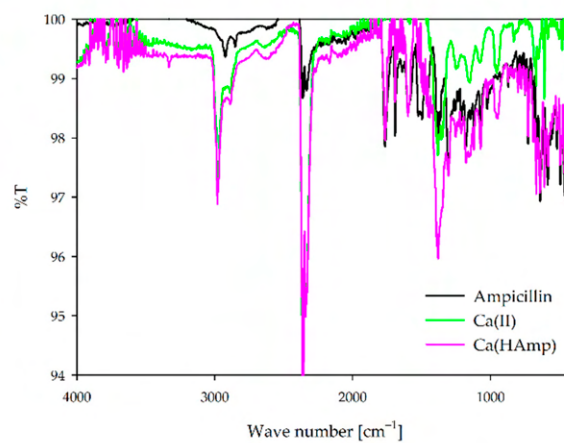


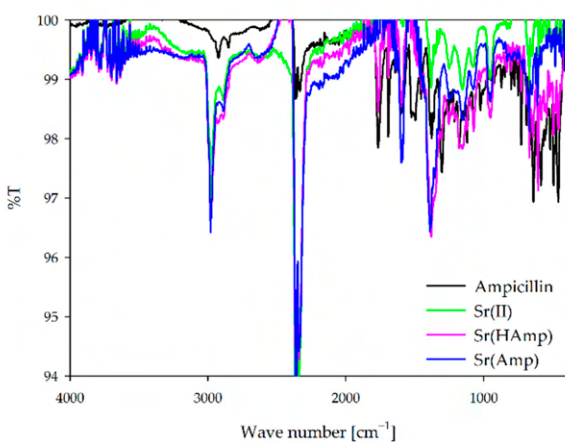
Figure S1. IR spectra of ampicillin.



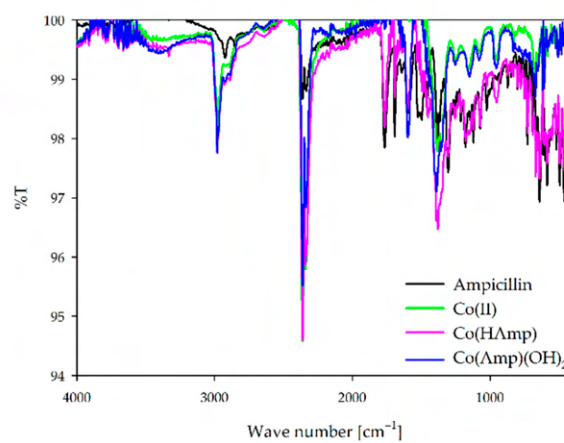
(a)



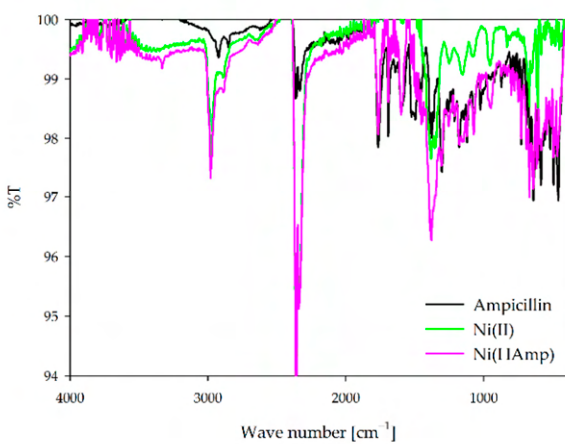
(b)



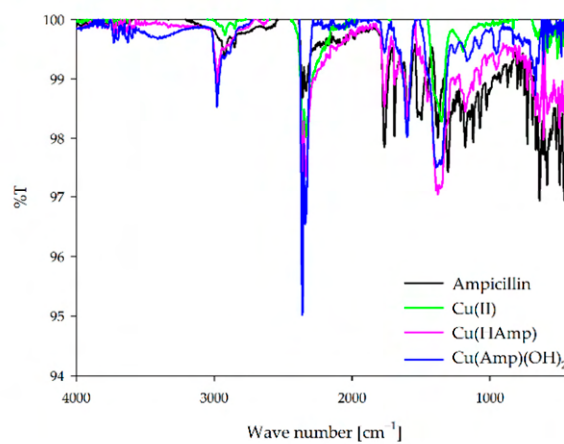
(c)



(d)



(e)



(f)

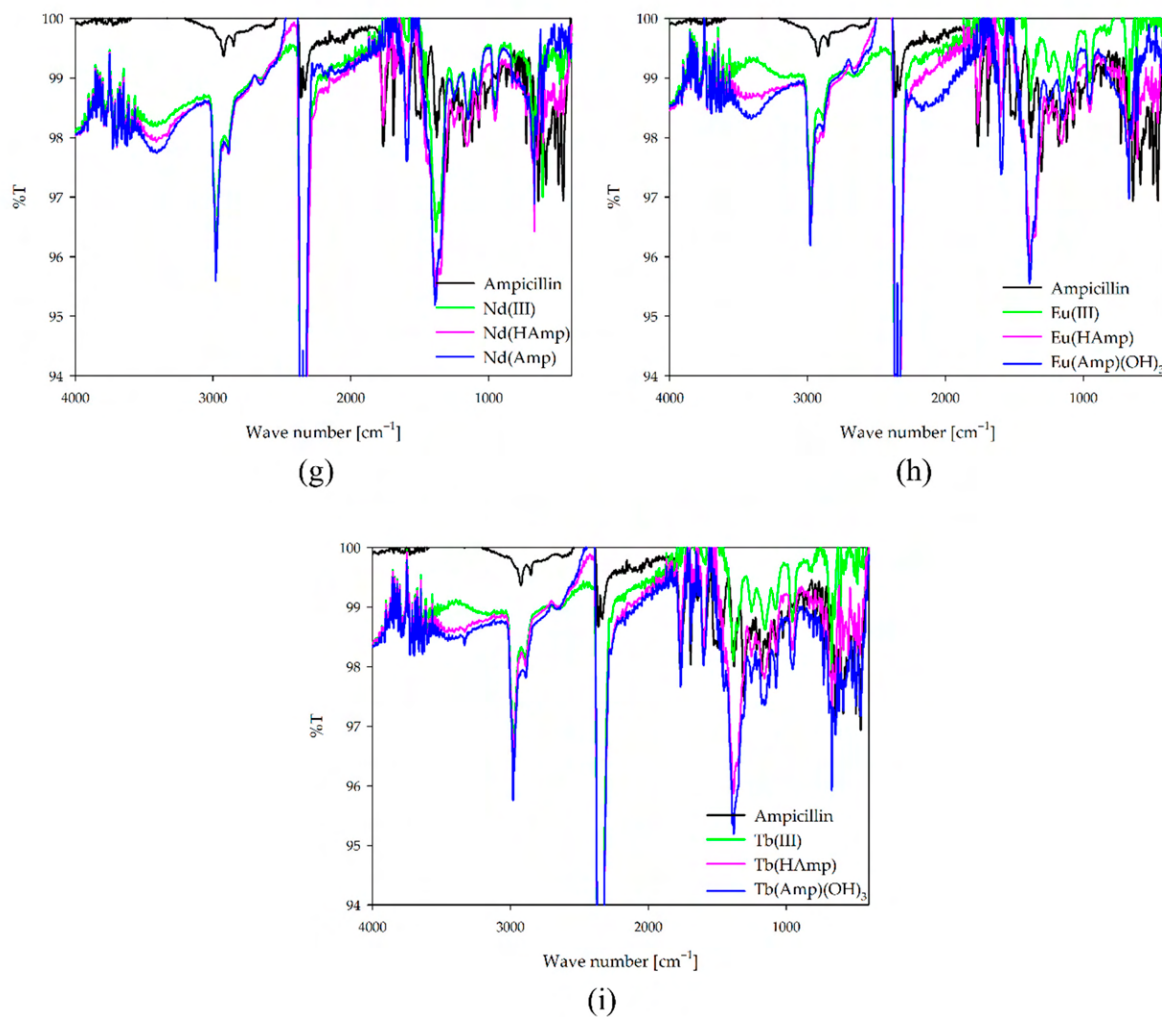
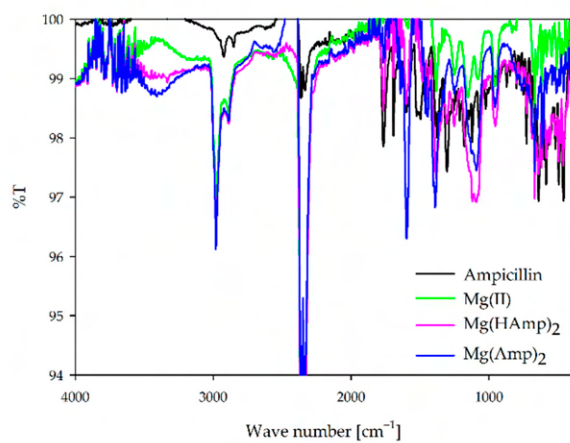
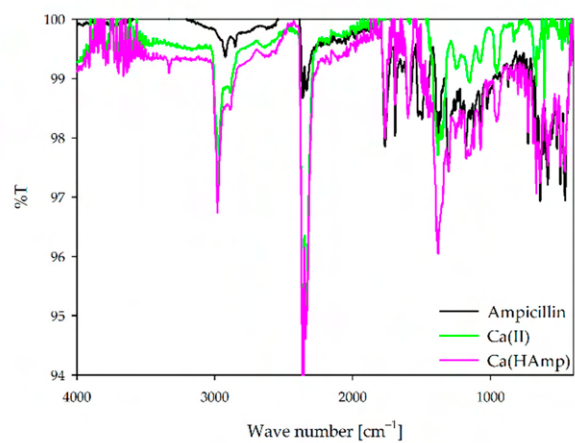


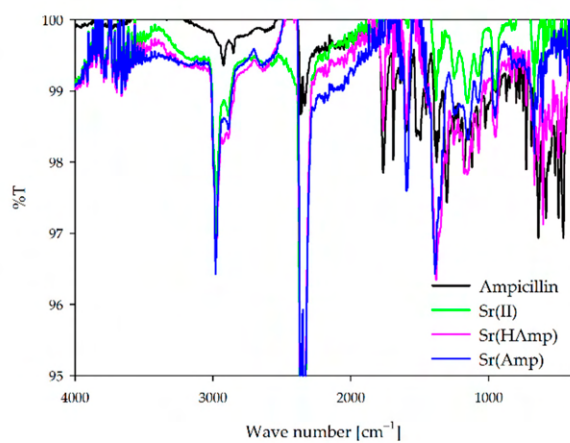
Figure S2. IR spectra in equimolar system of: (a) Mg(II)/ampicillin; (b) Ca(II)/ampicillin; (c) Sr(II)/ampicillin; (d) Co(II)/ampicillin; (e) Ni(II)/ampicillin; (f) Cu(II)/ampicillin; (g) Nd(III)/ampicillin; (h) Eu(III)/ampicillin; (i) Tb(III)/ampicillin.



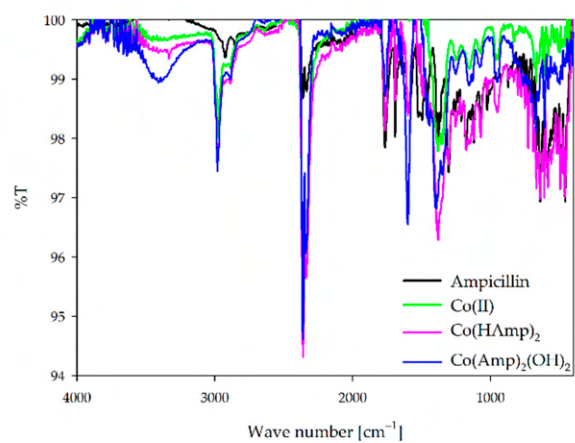
(a)



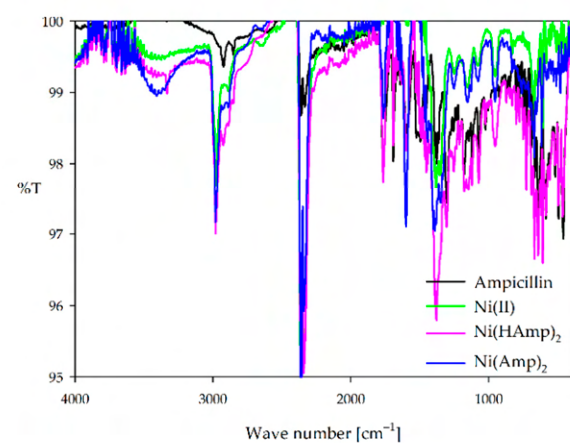
(b)



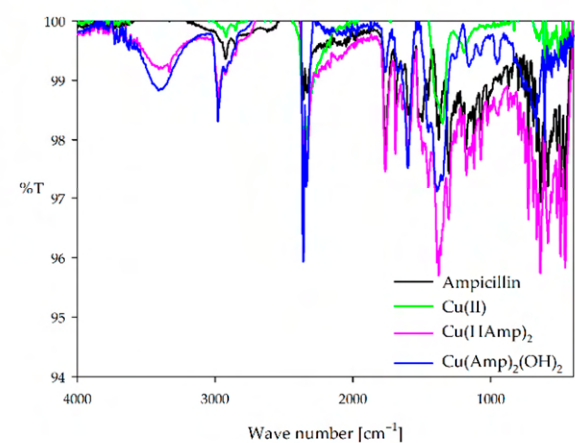
(c)



(d)



(e)



(f)

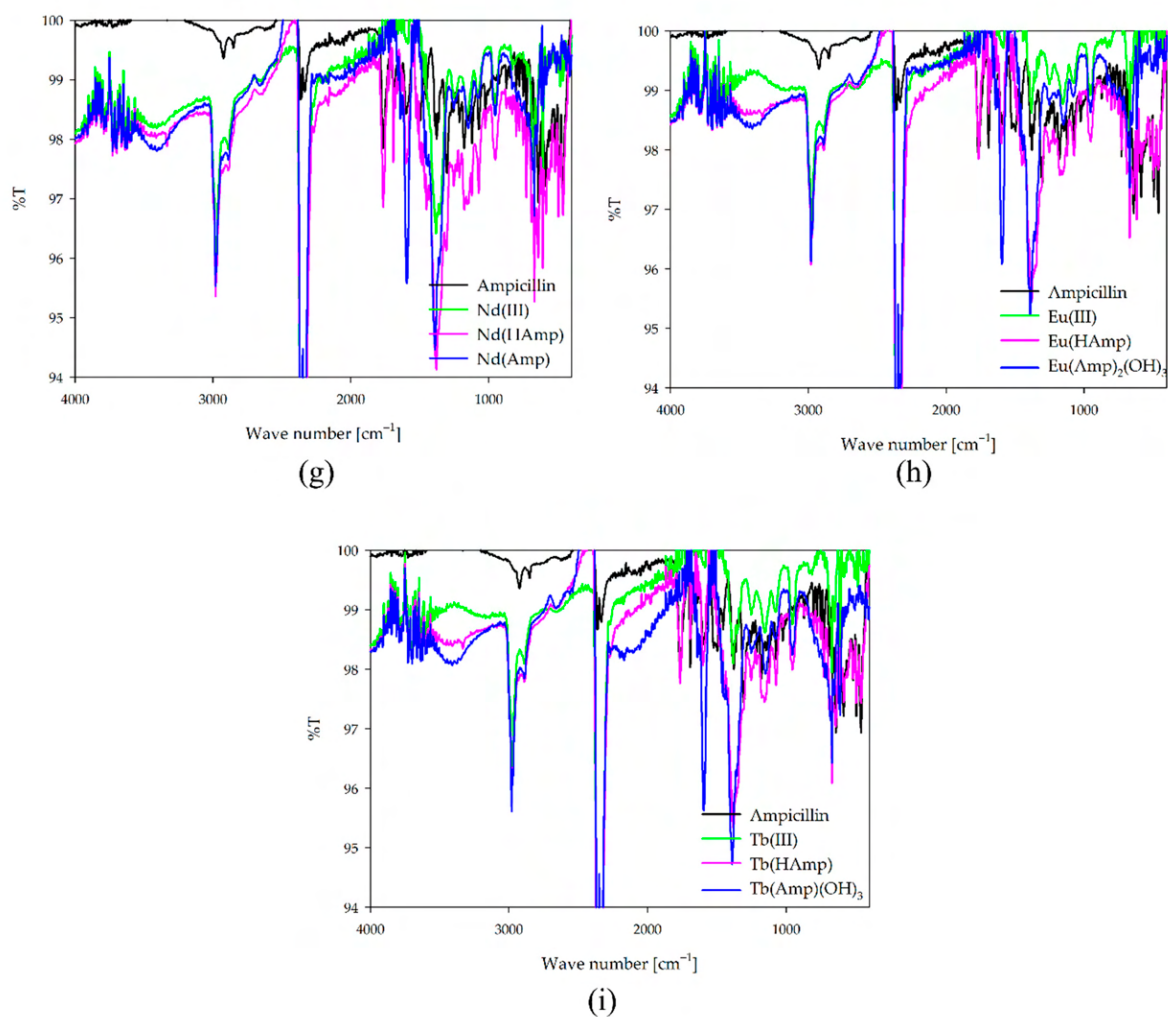


Figure S3. IR spectra in a system with a two-fold excess of antibiotic of: (a) Mg(II)/ampicillin; (b) Ca(II)/ampicillin; (c) Sr(II)/ampicillin; (d) Co(II)/ampicillin; (e) Ni(II)/ampicillin; (f) Cu(II)/ampicillin; (g) Nd(III)/ampicillin; (h) Eu(III)/ampicillin; (i) Tb(III)/ampicillin.

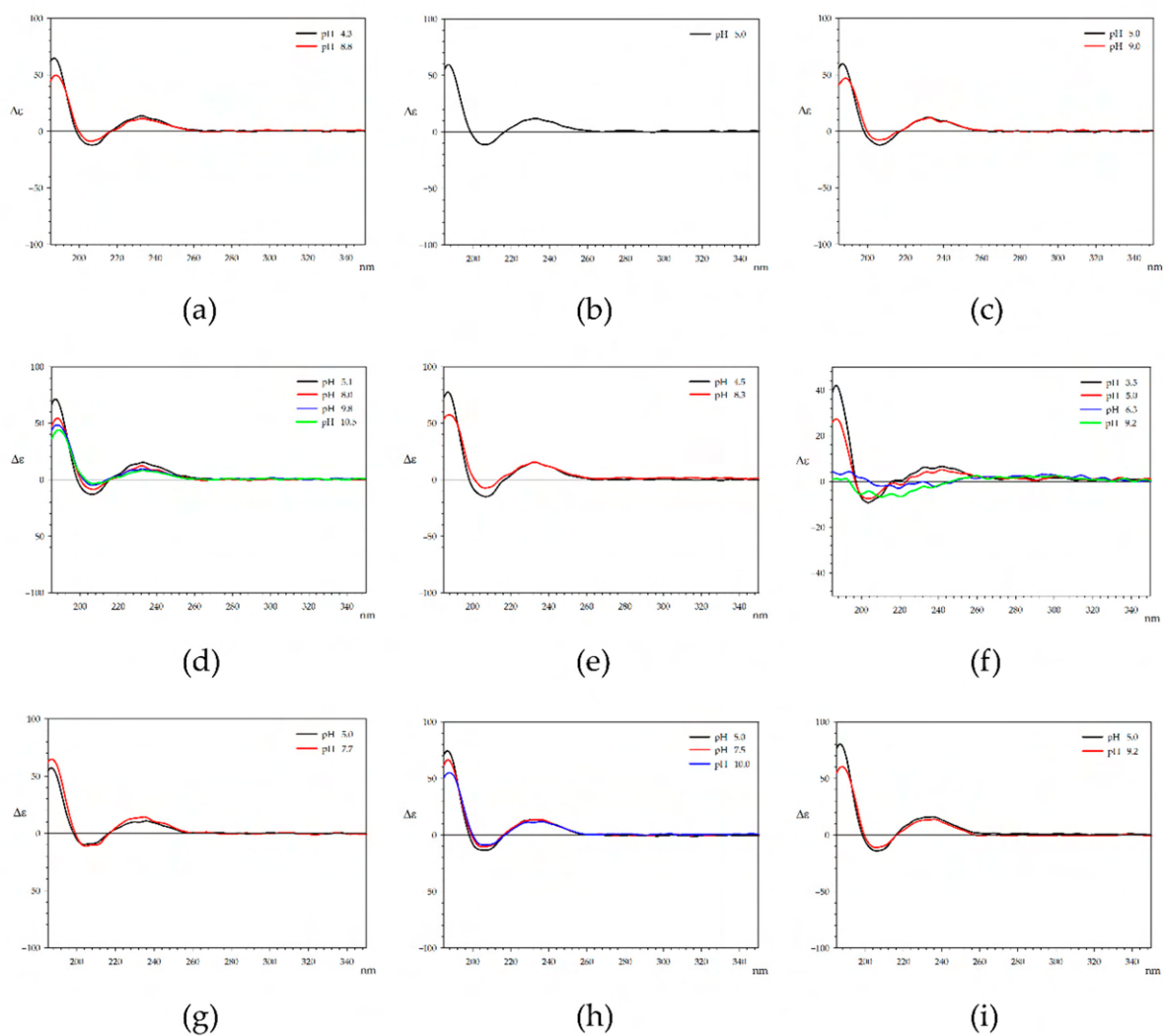


Figure S4. CD spectra in equimolar system of: (a) Mg(II)/ampicillin; (b) Ca(II)/ampicillin; (c) Sr(II)/ampicillin; (d) Co(II)/ampicillin; (e) Ni(II)/ampicillin; (f) Cu(II)/ampicillin; (g) Nd(III)/ampicillin; (h) Eu(III)/ampicillin; (i) Tb(III)/ampicillin.

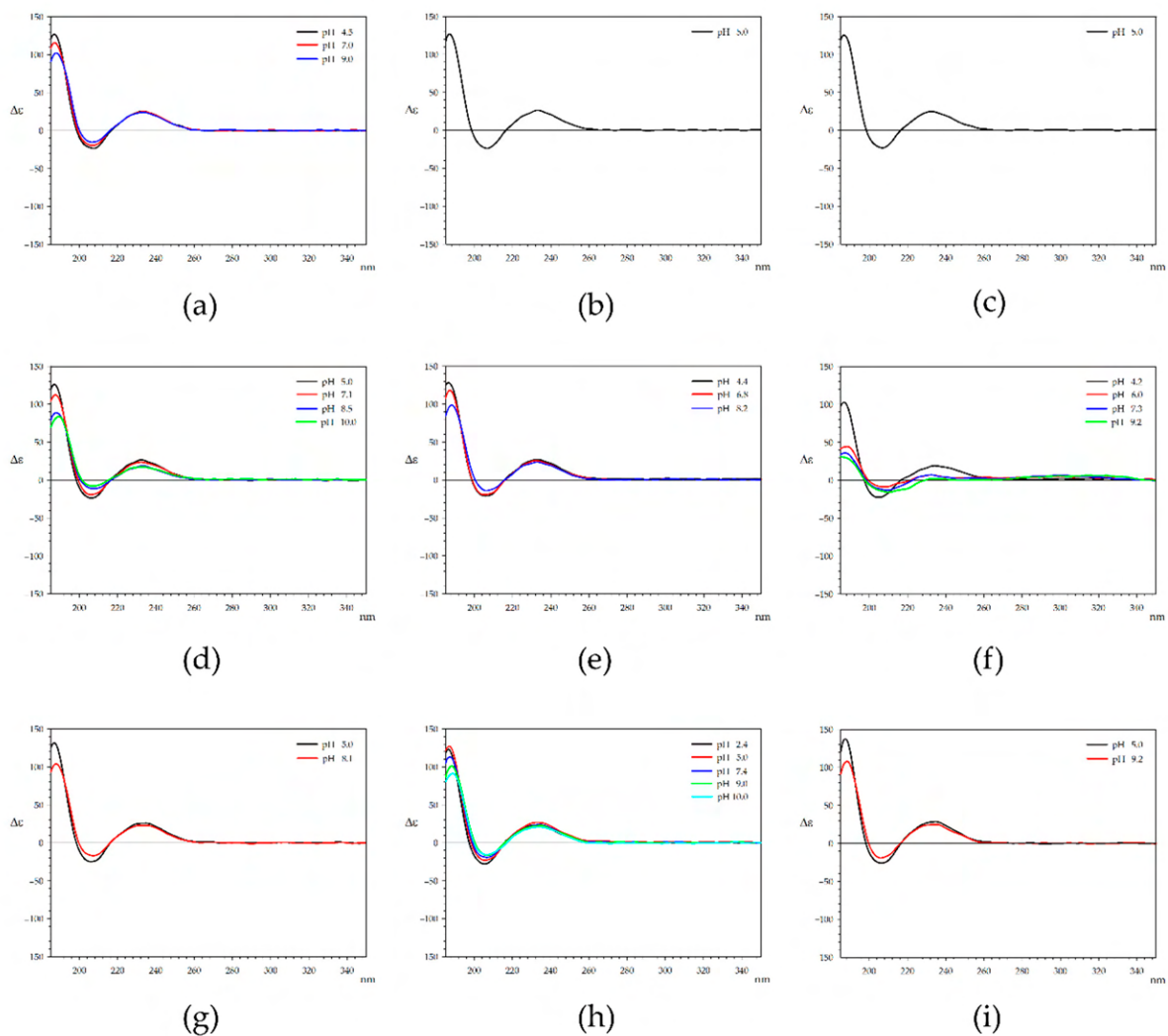


Figure S5. CD spectra in a system with a two-fold excess of antibiotic of: (a) Mg(II)/ampicillin; (b) Ca(II)/ampicillin; (c) Sr(II)/ampicillin; (d) Co(II)/ampicillin; (e) Ni(II)/ampicillin; (f) Cu(II)/ampicillin; (g) Nd(III)/ampicillin; (h) Eu(III)/ampicillin; (i) Tb(III)/ampicillin.

Imię i nazwisko:

Justyna Frymark

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies,
2025, Int. J. Mol. Sci. 26(15), 7605.

Autorzy publikacji:

Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Jakub Grajewski, Bartosz Tylkowski, Renata Jastrząb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji "*Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies*" mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, współtworzeniu metodologii badań, przeprowadzeniu analizy formalnej, realizacji badań eksperymentalnych, zarządzaniu danymi badawczymi, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, udziale w redakcji i korekcie tekstu, opracowaniu wizualizacji wyników oraz administracji projektem.

Poznań 26.06.2026

(miejsce i data)

Frymark
(podpis)

Imię i nazwisko:

Dr Michał Zabiszak

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies,
2025, Int. J. Mol. Sci. 26(15), 7605.

Autorzy publikacji:

Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Jakub Grajewski, Bartosz Tylkowski, Renata Jastrząb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji "*Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies*" mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, współtworzeniu metodologii badań, udziale w procesie walidacji wyników, przeprowadzeniu analizy formalnej, zapewnieniu zasobów niezbędnych do realizacji badań, zarządzaniu danymi badawczymi, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu oraz sprawowaniu nadzoru nad realizacją badań.

Poznań, 26.06.2026

(miejsce i data)

Zabiszak

(podpis)

Imię i nazwisko:

Prof. UAM dr hab. Jakub Grajewski

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies,
2025, Int. J. Mol. Sci. 26(15), 7605.

Autorzy publikacji:

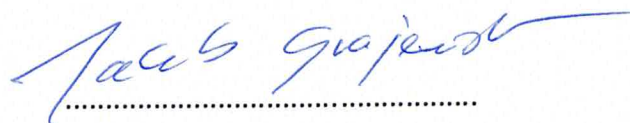
Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Jakub Grajewski, Bartosz Tylkowski, Renata Jastrząb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji "*Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies*" mój udział polegał na przeprowadzeniu analizy formalnej, realizacji badań eksperymentalnych, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu oraz udziale w redakcji i korekcie tekstu.

Poznań - 30.06.2026

(miejsce i data)



(podpis)

Imię i nazwisko:

Prof. Bartosz Tylkowski

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies,
2025, Int. J. Mol. Sci. 26(15), 7605.

Autorzy publikacji:

Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Jakub Grajewski, Bartosz Tylkowski, Renata Jastrząb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji "*Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies*" mój udział polegał na przeprowadzeniu analizy formalnej, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu oraz udziale w redakcji i korekcie tekstu.

Tarragona, 25/06/2026..

(miejsce i data)

BARTOSZ
TYLKOWSKI -
DNI X4084680H

Firmado digitalmente por
BARTOSZ TYLKOWSKI - DNI
X4084680H

..... Fecha: 2026.06.25 15:38:57
+02'00'

(podpis)

Imię i nazwisko:

Prof. dr hab. Renata Jastrzęb

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies,
2025, Int. J. Mol. Sci. 26(15), 7605.

Autorzy publikacji:

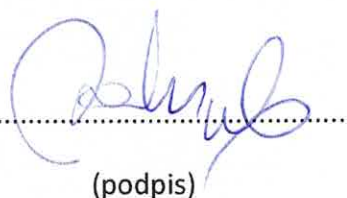
Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Jakub Grajewski, Bartosz Tylkowski, Renata Jastrzęb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji "*Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies*" mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, współtworzeniu metodologii badań, udziale w procesie walidacji wyników, zapewnieniu zasobów niezbędnych do realizacji badań, udziale w redakcji i korekcie tekstu oraz sprawowaniu nadzoru nad realizacją badań.

Poznań 26.06.2026

(miejsce i data)


(podpis)

- A2** **Frymark, J.*;** Zabiszak, M.; Ogawa, K.; Jastrzab, R.
Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic
characterization of complexes compounds of amoxicillin.
J. Mol. Liq. **2026**, *444*, 129190.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.129190>
[IF =6,000, MNiSW = 100]



Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin

Justyna Frymark^{a,*}, Michał Zabiszak^a, Kazuma Ogawa^b, Renata Jastrzab^a

^a Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland

^b Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Amoxicillin

Metal ions

Complex compounds

Spectroscopy studies

Potentiometric measurements

ABSTRACT

Coordination complexes of amoxicillin with selected metal ions (Mg(II), Ca(II), Sr(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Nd(III), Eu(III), and Tb(III)) were investigated using potentiometric titration and spectroscopic methods (UV–Vis, EPR, IR, Luminescence). The study focused on determining the stability constants of the complexes formed in aqueous solutions and analysing the coordination mode of amoxicillin. Equilibrium studies provided insight into the influence of metal ions on the structural organization of the ligand. Spectroscopic methods, were employed to characterize the coordination environment of metal centres and confirm the structural variations induced by complex formation. The obtained results contribute to a deeper understanding of the interaction mechanisms between amoxicillin and metal ions, which may have implications for its pharmacological and environmental behavior.

1. Introduction

Amoxicillin (Amox) (Fig. 1) is a widely used semi-synthetic β -lactam antibiotic derived from penicillin [1–4]. It exhibits a broad spectrum of activity, effectively treating bacterial infections caused by Gram-positive and Gram-negative pathogens, including *streptococci*, *pneumococci*, *enterococci*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella*, *Chlamydia trachomatis*, *Salmonella*, *Borrelia burgdorferi*, and *Helicobacter pylori* [3–7]. The mechanism of action of amoxicillin involves inhibiting bacterial cell wall synthesis by targeting penicillin-binding proteins critical for peptidoglycan cross-linking [7–9].

Despite the efficacy of antibiotics such as amoxicillin in the treatment of bacterial infections, the excessive and inappropriate use of these drugs has accelerated the development of antibiotic-resistant bacterial strains, which pose a significant threat to public health [2,10,11]. Antibiotic resistance is a critical global health challenge of the contemporary era, jeopardising the efficacy of antibiotics that have revolutionised modern medical practice. The World Health Organization has identified it as a pressing priority, with resistant bacterial infections estimated to account for approximately 700,000 deaths annually—a figure projected to increase dramatically without intervention [12–15]. Multidrug-resistant pathogens, commonly referred to as

“superbugs,” complicate routine medical procedures, increase mortality rates, and exert immense pressure on healthcare systems [16–19].

Addressing the global crisis of antibiotic resistance requires the implementation of innovative approaches to combat this pressing challenge [20–23]. This multifaceted strategy should include the development of novel antibiotics, the exploration of alternative therapeutic modalities, and the adoption of methodologies to improve the efficacy of existing pharmaceutical agents [22–26]. One particularly promising avenue involves the investigation of coordination compounds of β -lactam antibiotics, which have the potential to restore the effectiveness of these critical drugs against resistant bacterial strains. Elucidating the properties and mechanisms of these antibiotic complexes could provide invaluable insights to mitigate the widespread and growing impact of this global health threat [23,27–29].

The complexation of amoxicillin with metal ions represents a promising strategy to enhance the pharmacological properties of this β -lactam antibiotic. Investigating the ability of amoxicillin to form metal complexes is a crucial area of research. This is important not only due to the widespread clinical use of amoxicillin in the treatment of bacterial infections, but also due to the presence of potential coordination sites within the molecular structure of the antibiotic [28–32]. By forming complexes with metal ions, amoxicillin can generate compounds exhibiting improved characteristics compared to the uncomplexed

* Corresponding author.

E-mail address: justyna.frymark@amu.edu.pl (J. Frymark).

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.129190>

Received 24 October 2025; Received in revised form 15 December 2025; Accepted 23 December 2025

Available online 24 December 2025

0167-7322/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

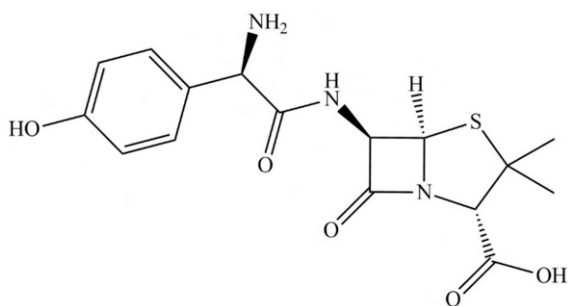


Fig. 1. Formula of amoxicillin.

Table 1

The protonation constants of the overall stability constants ($\log\beta$) compared to literature data [49,50].

Species	Our exp $\log\beta$	49 $\log\beta$	50 $\log\beta$
HAmox	10.02(1)	9.67(5)	9.84(1)
H ₂ Amox	17.74(1)	17.13(7)	17.50(1)
h ₃ Amox	20.13(1)	19.63(4)	20.60(1)

Table 2

The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with amoxicillin and s-block elements (standard deviations are given in parentheses).

Species		Mg(II)		Ca(II)		Sr(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M (H ₃ Amox)	25.56 (4)	5.44	–	–	24.72 (8)	4.59
	M (H ₂ Amox)	23.27 (4)	5.53	20.51 (4)	2.78	21.89 (8)	4.15
	M (HAmox)	15.44 (4)	5.42	12.48 (3)	2.46	14.35 (7)	4.33
	M (H ₃ Amox)	24.95 (3)	4.82	–	–	23.68 (4)	3.55
	M (H ₂ Amox)	22.44 (3)	4.71	20.41 (6)	2.67	21.49 (3)	3.76
	M (HAmox)	14.60 (2)	4.59	12.87 (4)	2.85	13.61 (3)	3.59

antibiotic molecules [33–35]. These enhanced features may include increased resistance to degradation by β -lactamases, better stability under physiological conditions, or expanded antimicrobial spectra. Furthermore, incorporating specific metal ions such as copper, europium, or magnesium can confer additional antimicrobial effects or modulate other biological activities [36]. The selected metal ions (Mg, Ca, Sr, Co, Ni, Cu, Nd, Eu, Tb) represent elements of well-established biological or pharmacological relevance. Mg(II) and Ca(II) are essential biometals involved in numerous physiological processes, while first-row transition metals such as Co(II), Ni(II) and Cu(II) are known for their catalytic, redox-active and bioactive properties [37–39]. The lanthanide ions Eu(III) and Tb(III), in turn, are widely used in biomedical imaging and luminescence-based analytical techniques due to their characteristic optical behavior [40,41]. The potential applications of these amoxicillin-metal complexes extend beyond infection management, potentially involving roles in anti-inflammatory therapies, targeted drug delivery, or diagnostic imaging. Research in this domain aligns with the urgent need to develop new strategies to combat the growing global challenge of antibiotic resistance [28,30,42,43].

The primary goal of this research was to obtain and characterize a series of complex compounds of amoxicillin with various metal ions, and

then to investigate their structural and physicochemical properties. Potentiometric measurements were adopted to explore the interactions between these amoxicillin-metal complexes with various metal ions, such as Mg(II), Ca(II), Sr(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Nd(III), Eu(III), and Tb(III). Then, advanced spectroscopic techniques, including UV–Vis, IR, EPR, and luminescence, were then utilized to elucidate the structure and coordination behavior of these complex compounds. These findings contribute to the growing body of knowledge on antibiotic–metal complexation, offering insights into the coordination modes and physicochemical characteristics of amoxicillin in the presence of different metal ions. Although metal coordination has been reported to influence the biological behavior of β -lactam antibiotics, including their susceptibility to β -lactamase hydrolysis and antimicrobial activity, such aspects were beyond the scope of the present work. The study was intentionally limited to a physicochemical characterization of the amoxicillin–metal systems, focusing on equilibrium analysis, stability constants, and spectroscopic identification of coordination modes.

2. Material and methods

2.1. Materials

Metal nitrates (Mg(II), Ca(II), Sr(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Nd(III), Eu(III), and Tb(III)) along with Amoxicillin were procured from Merck (Darmstadt, Germany) and used without further purification. Metal ion solution concentrations were verified through inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). All solutions for equilibrium studies were prepared with purified, carbonate-free water (conductivity: 0.055 μ S).

2.2. Equilibrium study

Potentiometric measurements for equilibrium studies were performed using a Titrand 905 Metrohm system, which was equipped with an autoburette and a Metrohm electrode (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). Prior to each series of measurements, the pH meter was calibrated using standard buffer solutions with pH values of 4.002 and 9.225 to ensure accuracy. The experiments were conducted under controlled conditions, maintaining a constant temperature of 20 ± 1 °C, an ionic strength of 0.1 M (KNO₃), and a neutral helium atmosphere. A CO₂-free NaOH titrant was used throughout the process. Metal ion concentrations were kept at 0.001 M, and binary systems were studied at metal-to-ligand ratios of 1:1 and 1:2. Further details regarding the experimental setup, potentiometric procedures, and methods of calculation can be found in our earlier publications [44–47].

2.3. UV–vis spectroscopy

UV–Vis absorption spectra were recorded at room temperature using an Evolution 300 UV–Vis spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Madison, WI, USA) equipped with a xenon lamp. Measurements, performed in a Plastibrand PMMA cell (path length 1 cm), covered a wavelength range of 340–1000 nm with slit width 1 nm. Concentration of metal ions were 0.001 M, with molar ratios of metal to ligand at 1:1 and 1:2.

2.4. EPR spectroscopy

EPR studies were conducted at -196 °C using glass capillary tubes with a volume of 130 μ m³. Data were collected with an SE/X 2457 Radiopan spectrometer (Radiopan, Poznań, Poland) for copper ion systems, with a metal concentration of 0.005 M in a 3:1 water:glycol mixture. Both 1:1 and 1:2 metal-to-ligand ratios were investigated.

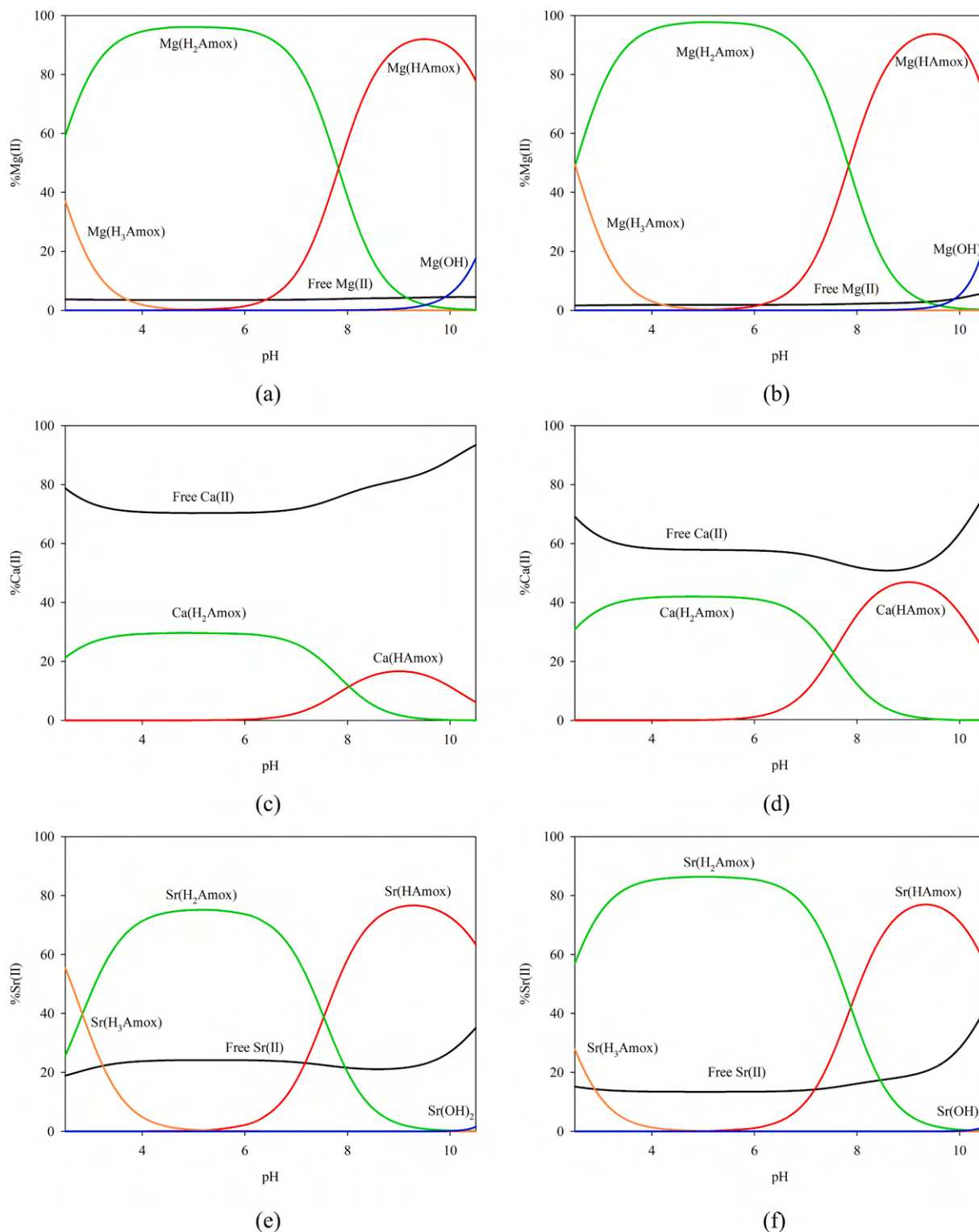


Fig. 2. Distribution diagram for the systems studied: (a) Mg(II)/Amoxicillin (1:1 ratio); (b) Mg(II)/Amoxicillin (1:2 ratio); (c) Ca(II)/Amoxicillin (1:1 ratio); (d) Ca(II)/Amoxicillin (1:2 ratio); (e) Sr(II)/Amoxicillin (1:1 ratio); (f) Sr(II)/Amoxicillin (1:2 ratio).

2.5. Luminescence spectroscopy

Luminescence was studied using an RF-6000 spectrofluorophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) with slit widths set at 5 nm. Concentration of metal ions were 0.001 M, with samples excited at 370 nm for terbium(III) ions over the 450–650 nm range and 395 nm for europium(III) ions over 500–740 nm range. Absorbance of the solution

at the excitation wavelength was maintained at <0.2 absorbance units. Samples were prepared using ultrapure water from a Simplicity Ultrapure Water System (Millipore, Darmstadt, Germany).

2.6. Infrared spectroscopy (FT-IR)

Infrared spectra were recorded on a Bruker INVENIO R FT-IR

Table 3

The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with amoxicillin and d-block elements (standard deviations are given in parentheses).

	Species	Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(H ₃ Amox)	23.99(4)	3.87	24.44(5)	4.31	–	–
	M(H ₂ Amox)	21.81(3)	4.08	21.83(4)	4.09	20.66(3)	2.92
	M(HAmox)	13.96(2)	3.94	14.35(3)	4.32	15.52(6)	5.50
	M(Amox)	–	–	–	–	9.63(6)	9.63
	M ₂ (Amox)	–	–	–	–	13.26(7)	13.26
	M(Amox)(OH)	–4.57(4)	9.20	–4.72(7)	9.05	1.59(2)	15.36
	M(Amox)(OH) ₂	–	–	–	–	–8.24(2)	3.94
	M(Amox)(OH) ₃	–	–	–	–	–19.60(3)	2.41
	M ₂ (Amox)(OH)	–	–	–	–	7.47(6)	19.59
	M ₂ (Amox)(OH) ₂	–	–	–	–	1.65(5)	2.16
1:2	M(H ₃ Amox)	23.70(5)	3.57	24.22(3)	4.09	–	–
	M(H ₂ Amox)	21.91(3)	4.17	21.95(2)	4.22	–	–
	M(HAmox)	14.03(2)	4.01	14.67(2)	4.65	–	–
	M(Amox)	–	–	4.60(6)	–4.60	–	–
	M(HAmox)(HAmox)	–	–	–	–	31.13(3)	11.09
	M(HAmox)(Amox)	–	–	–	–	24.94(3)	14.92
	M(Amox) ₂	–	–	–	–	16.87(4)	16.87
	M(Amox)(OH)	–4.67(3)	9.10	–4.05(2)	9.72	–	–
	M(Amox) ₂ (OH)	–	–	–	–	7.44(5)	4.34
	M(Amox) ₂ (OH) ₂	–	–	–	–	–3.15(8)	3.17
	M(Amox) ₂ (OH) ₃	–	–	–	–	–13.70(6)	3.22

spectrophotometer (Bruker, Bremen, Germany). Samples consisted of D₂O solutions containing amoxicillin and corresponding metal nitrates, with metal concentrations of 0.1 M and metal-to-ligand ratios of 1:1 or 1:2. All spectra were recorded using 32 scans at a spectral resolution of 2 cm^{–1} over the 4000–400 cm^{–1} wavenumber range. pH adjustment was done using either NaOD or DCl depending on the case (pD correction: pD = pH meter reading +0.4) [48].

3. Results and discussion

In this study, potentiometric titration was employed as the initial method to characterize the acid-base properties of amoxicillin and its ability to form complexes with metal ions. Determining the protonation constants was a crucial step, as these values provide essential information for understanding the speciation of amoxicillin in solution and its interactions with metal ions. Following this, spectroscopic techniques were applied to gain deeper insight into the structure and stability of the formed complexes, allowing for a comprehensive evaluation of the coordination modes and binding affinities.

The first stage of the conducted research involved determining the successive protonation constants of amoxicillin. The obtained values (shown in Table 1) were $\log\beta = 10.02(1)$ for HAmox, $\log\beta = 17.74(1)$ for H₂Amox, and $\log\beta = 20.13(1)$ for H₃Amox. Compared to literature data, these values show slight differences but the observed discrepancies may result from different experimental conditions, such as temperature and ionic strength of the solution, which significantly influence equilibrium constants. The analysis of protonation constants indicates that the deprotonation of the carboxyl group occurs at relatively low pH values, followed by the deprotonation of amino groups at higher pH. For clarity, the protonation steps have been assigned to the corresponding functional groups: pK_{a1} reflects deprotonation of the carboxyl group, whereas pK_{a2} and pK_{a3} arise from the successive deprotonation of the amino functionalities of the amoxicillin molecule. The obtained values were subsequently used as input data for further theoretical calculations and the analysis of complex compounds of amoxicillin with metal ions.

3.1. Equilibrium study of s-block elements

For s-block metal ions, such as Mg(II), Ca(II), and Sr(II), multiple potentiometric titrations were performed in both equimolar conditions

and with a two-fold excess of amoxicillin. Based on the obtained data, the overall stability constants ($\log\beta$) of the formed complexes and their equilibrium formation constants ($\log K_e$) were determined, as shown in Table 2. Using these stability constants, distribution diagrams of the complex species were generated (Fig. 2).

The complexes present in the systems are exclusively protonated forms of the M(H_xAmox) type. For magnesium ions, both in the equimolar system and in the system with an excess of antibiotic, there are three protonated forms that dominate in the systems, with over 90 % of the ions participating in coordination. The first complex, Mg(H₃Amox), appears at pH values below 2.5. As the pH increases and the carboxyl groups deprotonate, the Mg(H₂Amox) form becomes predominant up to pH 8.0, followed by the Mg(HAmox) form at higher pH values.

However, for calcium ions, only a small amount of the total ions engage in coordination throughout the studied pH range. In the equimolar system, approximately 70 % of the ions participate in complexation, whereas in the ligand-excess system, this decreases to around 60 %, leaving a significant proportion of unbound ions. Unlike magnesium, the calcium ion system exhibits only two protonated forms: Ca(H₂Amox) and Ca(HAmox).

The behavior of strontium ions closely resembles that of magnesium. In both equimolar and ligand-excess systems, around 80 % of the metal ions are involved in coordination, leaving only about 20 % unbound. Initially, at pH values below 2.5, the triply protonated Sr(H₃Amox) complex is present. As deprotonation progresses, the Sr(H₂Amox) form becomes dominant, binding approximately 80 % of the metal ions. Around pH 7.0, the Sr(HAmox) form predominates.

3.2. Equilibrium study of d-block elements

In the case of d-block metals, such as cobalt, nickel and copper ions, a greater variety of complex forms was observed, from protonated species, through simple complexes, to hydroxy complexes. From the obtained data, overall stability constants ($\log\beta$) and equilibrium formation constants ($\log K_e$) were determined; the results are shown in Table 3, and the distribution diagrams in Fig. 3.

For cobalt and nickel ions, the similar types of complexes are formed, whereas copper ions generate a broader range of species. In the system for cobalt and nickel ions, initially three protonated forms and one hydroxy complex, M(Amox)(OH), can be identified. In equimolar system,

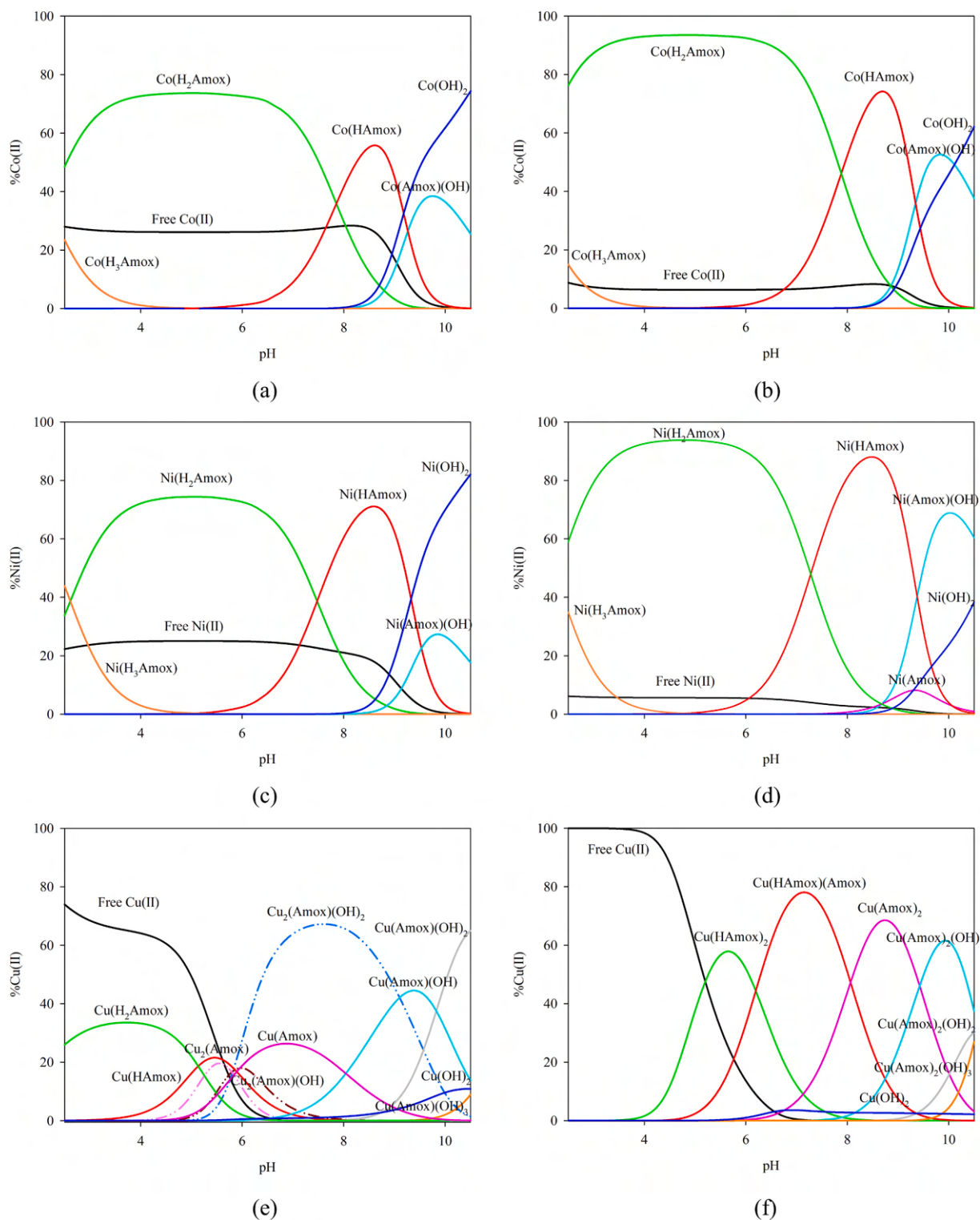


Fig. 3. Distribution diagram for the systems studied: (a) Co(II)/Amoxicillin (1:1 ratio); (b) Co(II)/Amoxicillin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/Amoxicillin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/Amoxicillin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/Amoxicillin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/Amoxicillin (1:2 ratio).

the first form appearing is $M(H_3Amox)$. For cobalt, this species is present from the beginning but never dominates, while for nickel ions, it has a more significant role. As the pH increases and the ligand deprotonates, the $M(H_2Amox)$ form becomes dominant, binding about 70 % of the metal ions. Above pH ~ 7.7 , the $M(HAmox)$ species predominates. At pH values above 9.0, the system is dominated by metal hydroxides, although the $M(Amox)(OH)$ form still binds around 40 % of cobalt and 30 % of

nickel ions.

In the case of systems with a two-fold excess of amoxicillin, we can have analogous forms to the equimolar system, but taking into account the greater participation of ions in the formation of complex compounds. Initially, the $M(H_3Amox)$ species also occurs, which does not dominate the system, the dominant form, which binds over 95 % of the ions present in the solution is the $Ni(H_2Amox)$ form. Next, with increasing

Table 4

The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with amoxicillin and f-block elements (standard deviations are given in parentheses).

	Species	Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(H ₂ Amox)	21.81(3)	4.08	22.26(4)	4.53	20.69(1)	2.95
	M(HAmox)	14.24(3)	4.22	14.46(5)	4.45	–	–
	M(Amox)(OH)	–	–	–1.05(5)	12.72	–	–
	M(Amox)(OH) ₂	–11.52(4)	2.25	–9.59(4)	5.23	–10.71(1)	3.06
	M(Amox)(OH) ₃	–	–	–	–	–22.82(1)	1.67
1:2	M(H ₂ Amox)	20.58(3)	2.85	22.56(5)	4.82	20.20(6)	2.47
	M(HAmox)	13.21(2)	3.19	14.84(5)	4.81	–	–
	M(Amox)(OH)	–	–	–0.99(5)	12.78	–2.93(3)	10.83
	M(Amox)(OH) ₂	–12.46(3)	15.39	–9.78(5)	4.97	–11.12(2)	5.57
	M(Amox)(OH) ₃	–	–	–	–	–22.28(4)	2.61

pH, the M(HAmox) form is formed, which binds about 80 % of the ions present in the solution. In the case of a system with nickel ions, a small percentage of ions, about 10 %, participates in the formation of a simple complex form of the M(Amox) type. However, above pH 9.0 hydroxy complexes appear alongside metal hydroxides. The Co(Amox)(OH) form binds ~50 % of cobalt ions, while for nickel, the corresponding Ni(Amox)(OH) form binds over 70 %.

For copper ions, a broader variety of complex forms was observed. In equimolar systems, nine distinct species are formed. Initially, about 35 % of the ions bind in the Cu(H₂Amox) form. Above pH 5.0, the system shows overlapping forms, involving both single and double coordination of copper ions, though none fully dominates. The dominant form in the system from pH 6.0 to pH 9.0 is the Cu₂(Amox)(OH)₂ form, which binds about 77 % of the ions present in the solution, coexisting with the simple Cu(Amox) form. At pH above 9.0, only hydroxy complexes of the type Cu(Amox)(OH)_x (x = 1–3) are observed. An example comparison of the theoretical curve with the experimental curve confirming the correctness of the selected set of complex compounds is presented in the supplementary materials in Fig. S1.

In the system with an excess of antibiotic, on the other hand, copper ions form complexes with two coordinated ligand molecules. Starting from pH 4.0, the Cu(HAmox)₂ form binding about 60 % of the ions present in the solution, then with an increase in pH and deprotonation of the antibiotic, a complex is formed where one of the amoxicillin molecules is already partially deprotonated Cu(HAmox)(Amox). then with increasing pH, from pH 9.0, we can observe the Cu(Amox)₂ complex, where both ligands are fully deprotonated. At higher pH, the next forms appearing in solution are the forms of hydroxy complexes of the Cu(Amox)₂(OH)_x (where x = 1–3).

3.3. Equilibrium study of f-block elements

In the case of f-block ions, the behavior of neodymium, europium and terbium ions was also studied. The data obtained allowed the determination of the overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes, which are presented in Table 4 and the distribution diagrams presented in Fig. 4. In systems with f-block elements, only proton and hydroxy complex forms were identified.

For neodymium ions in an equimolar system, the initial species is the protonated form Nd(H₂Amox), which is bound by nearly 70 % of the ions present in the solution. Surprisingly, in the system with an excess of ligand, only 50 % of neodymium ions participate in the formation of this form. Then, in both systems, the protonated form of the Nd(HAmox) type appears, which binds about 50 % of the ions present in the solution. At higher pH, another complex form occurring in the systems is the dihydroxy complex form, which coexists with neodymium hydroxides.

For europium ions, a higher degree of complexation is observed compared to neodymium. In the equimolar system, about 80 % of the

ions form the Eu(H₂Amox) species, while in the excess ligand system, almost all europium ions are complexed in this form. At pH ~7.5, the Eu(HAmox) species appears but is quickly replaced by a monohydroxy complex due to further deprotonation. This hydroxy complex binds 50 % of the ions in the equimolar system and ~60 % in the excess system. The dominant species at higher pH in both cases is the dihydroxy complex, which binds ~80 % of the europium ions.

For terbium ions, only minor differences are observed between the equimolar and excess-ligand systems. Initially, the Tb(H₂Amox) species is present but does not dominate, as only ~30 % of terbium ions are involved. Subsequently, only hydroxy complexes are observed. In the equimolar system, the dihydroxy complex binds ~80 % of the ions, while the trihydroxy form begins to appear at pH ~10.0. In the excess system, three hydroxy forms are present: the monohydroxy form coexists near pH 8.0 without dominating; the dihydroxy complex, Tb(Amox)(OH)₂, binds ~80 % of the ions; and the trihydroxy form, Tb(Amox)(OH)₃, emerges above pH 9.5, binding ~20 % of the terbium ions.

3.4. UV–Vis spectroscopy

The UV–Vis spectra shown in Fig. 5 confirm the coordination of cobalt(II), nickel(II), and copper(II) ions with amoxicillin, as evidenced by characteristic shifts in absorption bands and changes in spectral intensity (shown in Table 5). The observed d-d transitions, typical of these transition metals, reflect modifications in the coordination environment under varying pH conditions.

In cobalt(II) systems (Fig. 5a, b), a red shift of absorption bands is observed in both equimolar (Co(HAmox)) and ligand-excess (Co(HAmox)₂) complexes, suggesting modifications in the internal coordination sphere. These changes indicate alterations in ligand binding or coordination geometry. At higher pH values, the formation of hydroxy complexes leads to precipitation, limiting further spectral analysis.

For nickel(II) complexes (Fig. 5c, d), a slight red shift of absorption bands is observed with increasing pH, accompanied by a gradual decrease in the molar absorption coefficient at the maximum wavelength. This trend suggests rearrangements in the ligand field and potential changes in coordination geometry.

In copper(II) systems (Fig. 5e, f), an opposite trend is observed: the absorption bands shift toward lower wavelengths (blue shift) with increasing pH, accompanied by an increase in molar absorption coefficient. This shift, along with a rise in the molar absorption coefficient, suggests structural reorganization in the coordination sphere, likely due to ligand deprotonation and rearrangement. At higher pH values, precipitation prevented further spectral measurements.

Overall, the UV–Vis spectral analysis highlights pH-dependent transformations in the coordination modes of metal-amoxicillin complexes, underscoring the dynamic nature of metal-ligand interactions in these systems.

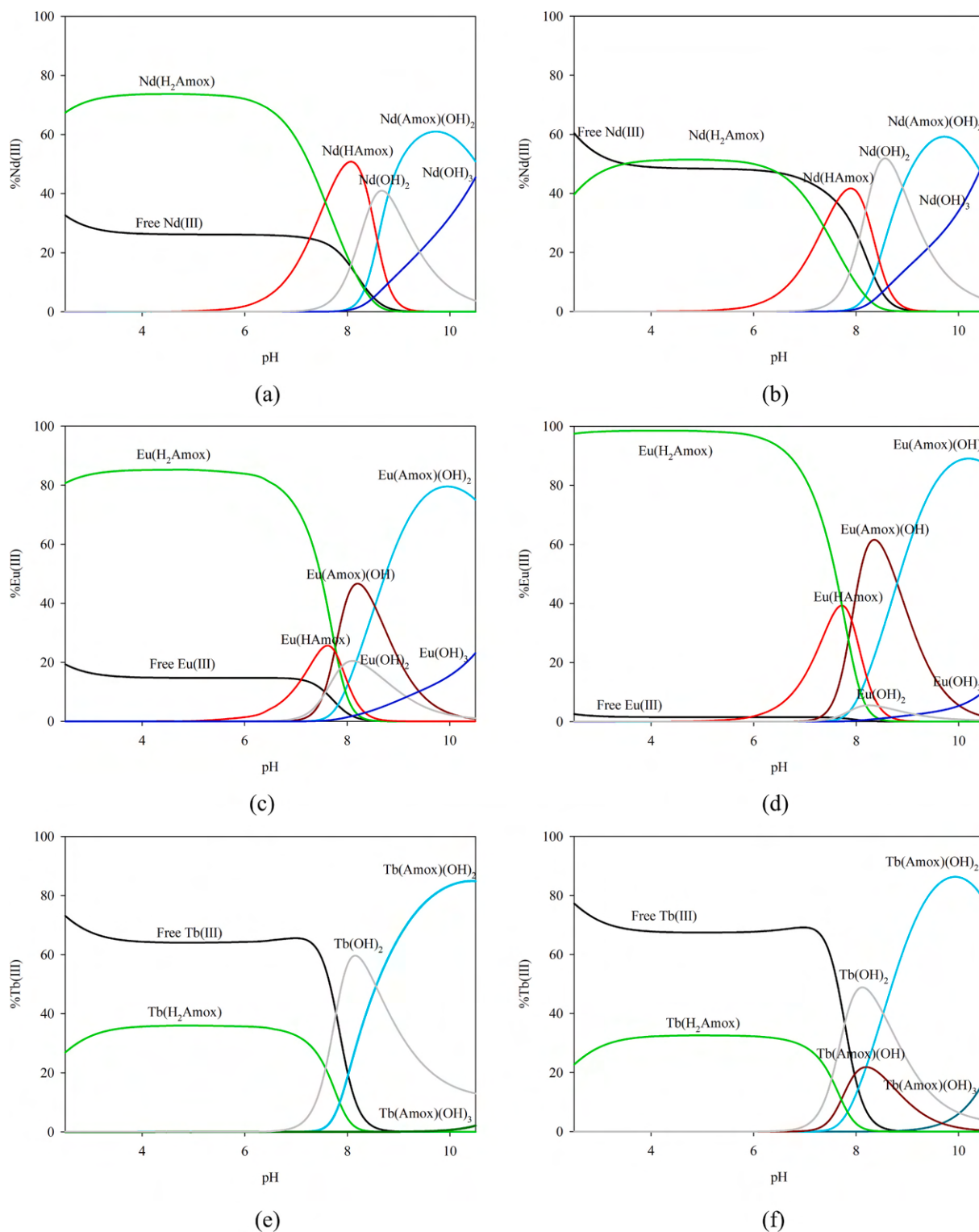


Fig. 4. Distribution diagram for the systems studied: (a) Nd(III)/Amoxicillin (1:1 ratio); (b) Nd(III)/Amoxicillin (1:2 ratio); (c) Eu(III)/Amoxicillin (1:1 ratio); (d) Eu(III)/Amoxicillin (1:2 ratio); (e) Tb(III)/Amoxicillin (1:1 ratio); (f) Tb(III)/Amoxicillin (1:2 ratio).

3.5. EPR spectroscopy

EPR measurements confirmed the presence of paramagnetic mononuclear complexes in the studied systems with copper(II) ions (Fig. 6). At lower pH values, characteristic Cu(II) spectra were recorded, with parameters indicating a square-planar coordination geometry. In the equimolar system, the $g_{\parallel}$ and $A_{\parallel}$ values suggest coordination through

the oxygen atom of a partially deprotonated amoxicillin ligand, forming the $\text{Cu}(\text{HAmox})$ complex. In the system with an excess of amoxicillin, the formation of $\text{Cu}(\text{HAmox})_2$ was identified, indicating coordination involving two ligand molecules in a similar mode. The axial character of the spectra, with $g_{\parallel}$ values in the range 2.27–2.30, is consistent with a tetragonally elongated Cu(II) centre and indicates the involvement of mixed O,N-donor atoms of amoxicillin. According to the classical

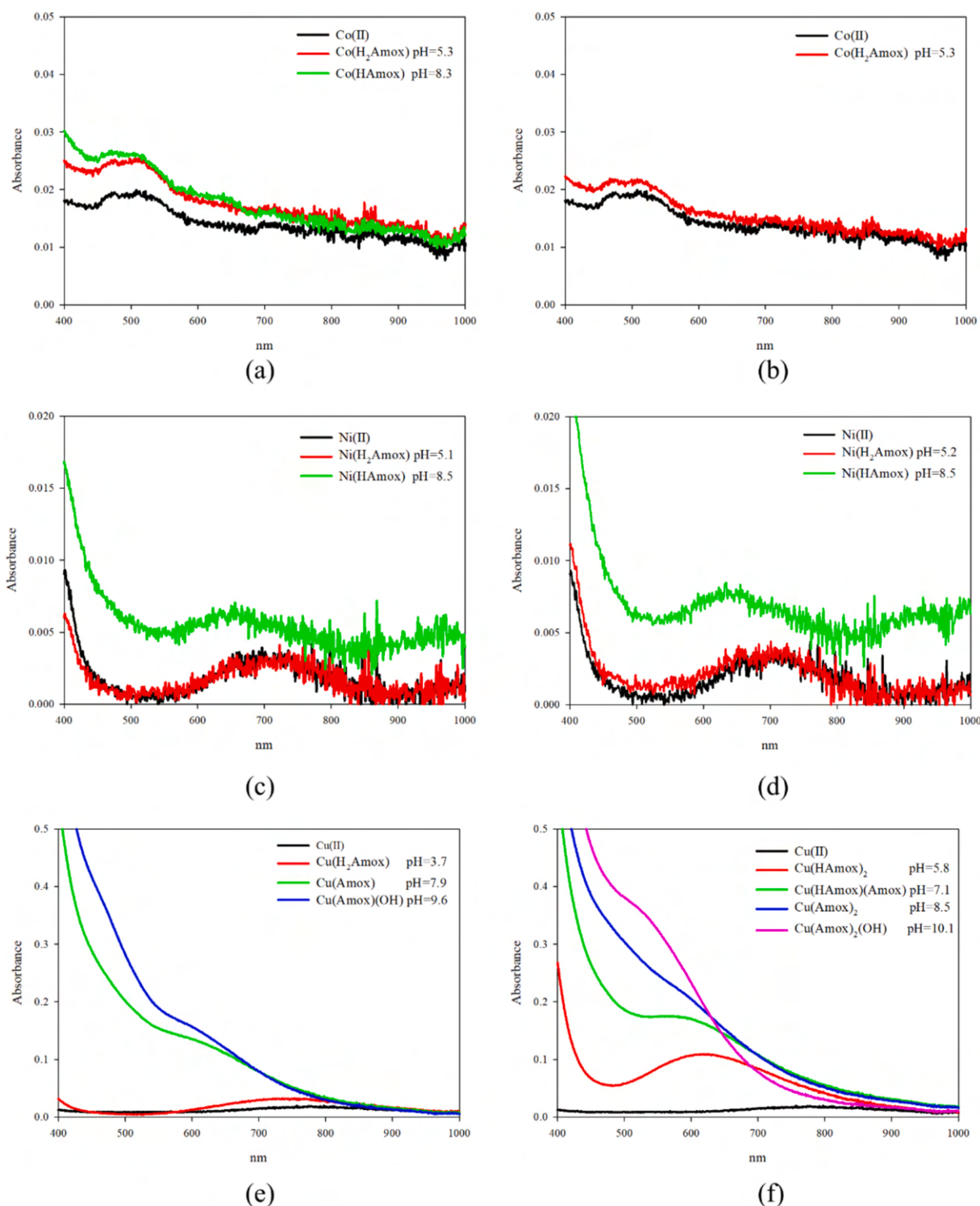


Fig. 5. UV-Vis absorption spectra of: (a) Co(II)/Amoxicillin (1:1 ratio); (b) Co(II)/Amoxicillin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/Amoxicillin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/Amoxicillin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/Amoxicillin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/Amoxicillin (1:2 ratio).

correlations of Hathaway and Billing [51], $g_{\parallel}$ values above 2.25 together with moderate $A_{\parallel}$ constants are characteristic of Cu(II) complexes containing at least one nitrogen donor in the equatorial plane, often accompanied by a deprotonated oxygen donor. This suggests that the coordination environment in both $\text{Cu}(\text{H}_2\text{Amox})$ and $\text{Cu}(\text{HAmox})_2$ most likely includes contributions from the amino nitrogen and/or carboxylate oxygen depending on the degree of ligand deprotonation.

The heterogeneous hyperfine structure observed in the EPR spectra

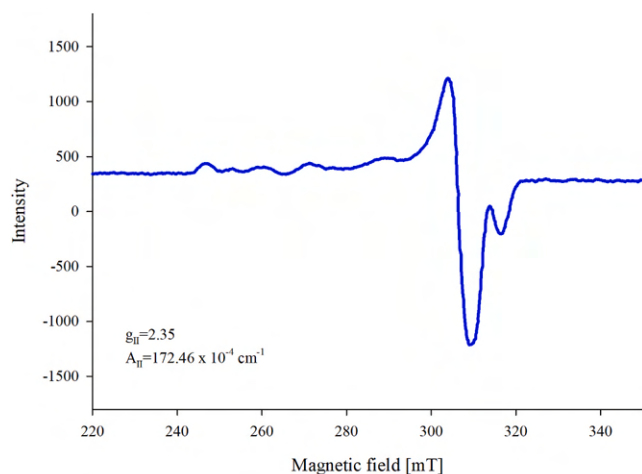
may indicate the presence of more than one Cu(II) coordination environment in solution. This observation is consistent with the distribution diagram, which predict partial overlap of $\text{Cu}(\text{HAmox})$ and $\text{Cu}(\text{Amox})$ species at the pH values used for EPR measurements.

As the pH increased, the EPR spectra showed a shift toward higher $g_{\parallel}$ values, indicating changes in the ligand field and coordination environment around the Cu(II) ions. This suggests a modification in the binding mode, likely involving further ligand deprotonation and a

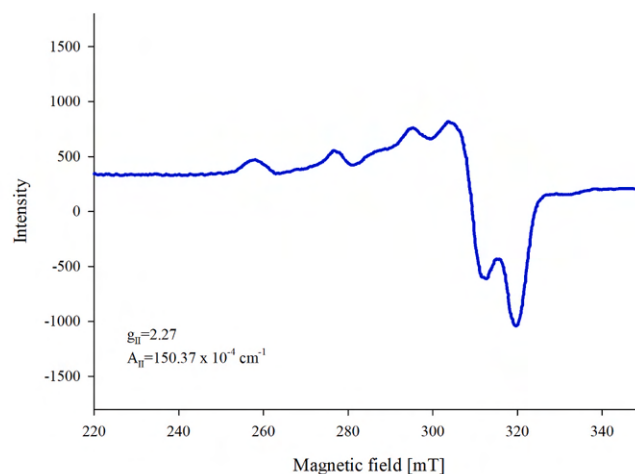
Table 5

Spectral parameters of binary complexes formed in systems of d-electron metal ions with amoxicillin.

	Species		pH	A	$\lambda_{\max}$ [nm]	ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
1:1	Co(II)	M(H ₂ Amox)	5.3	0.0253	504	25.3
		M(HAmp)	8.3	0.0263	510	26.3
	Ni(II)	M(H ₂ Amox)	5.1	0.0041	709	4.1
		M(HAmp)	8.5	0.0080	639	8.0
		M(H ₂ Amox)	3.7	0.0316	734	31.6
	Cu(II)	M(Amox)	7.9	0.1350	607	135.0
		M(Amox)(OH)	9.6	0.1608	594	160.8
	Co(II)	M(H ₂ Amox)	5.3	0.0216	512	21.6
		M(H ₂ Amox)	5.2	0.0034	713	3.4
	Ni(II)	M(HAmp)	8.5	0.0068	657	6.8
1:2	Cu(II)	M(HAmp) ₂	5.8	0.1105	620	110.5
		M(HAmp)(Amox)	7.1	0.1717	589	171.7
		M(Amox) ₂	8.5	0.2233	580	223.3
		M(Amox) ₂ (OH)	10.1	0.3481	530	348.1



(a)



(b)

Fig. 6. EPR spectra of: (a) Cu(H₂Amox) at pH = 3.8; (b) Cu(HAmp)₂ at pH = 5.6.

transition toward a more distorted tetragonal geometry. The observed hyperfine splitting constants confirm changes in the electronic structure of the copper(II) centers, supporting pH-dependent transformations in coordination.

3.6. Luminescence spectroscopy

Emission spectra were recorded for binary systems of amoxicillin with europium(III) and terbium(III) ions at pH values corresponding to the dominant complex forms (Fig. 7). For europium(III) complexes, characteristic emissions were observed from the ⁵D₀ state to the ⁷F_j (j = 1, 2, 3, 4) levels, as well as from the ⁵D₁ state to the ⁷F₂ level. A significant increase in the intensity of the ⁵D₀ → ⁷F₂ band was noted for Eu (Amox)(OH), while quenching effects were observed for other complexes. At higher pH values, the formation of europium(III) hydroxide limited further emission measurements.

For terbium(III) complexes, excitation led to emissions from the ⁵D₄ state to the ⁷F_j (j = 3, 4, 5, 6) levels. The intensity of the characteristic ⁵D₄ → ⁷F₅ transition increased for Tb(H₂Amox), while a shift in emission bands was observed for the hydroxy complex Tb(Amox)(OH). A sharp decrease in emission intensity occurred at higher pH values, with quenching effects more pronounced in systems with excess amoxicillin. These spectroscopic changes confirm modifications in the coordination environment of the metal ions upon complexation.

3.7. IR spectroscopy

The infrared spectra of amoxicillin-metal ion complexes (Fig. 8) confirm the presence of characteristic functional groups and provide valuable insights into potential structural modifications or intermolecular interactions. Spectra were recorded for different complex variants under identical conditions to detect variations in functional group vibrations. Shifts in band positions and intensity changes indicate interactions involving the carboxyl group, amide carbonyl, β-lactam ring, and hydroxyl groups, suggesting structural alterations upon complexation.

The carboxylate (COO⁻) group is identified by an absorption band around 1390 cm⁻¹, corresponding to asymmetric stretching vibrations. Shifts in this region reflect changes in the electronic environment of the carboxyl functionality, likely due to coordination or hydrogen bonding. Additional key absorption bands appear near 1685 cm⁻¹, 1766 cm⁻¹, and 3383 cm⁻¹, associated with the amide carbonyl, β-lactam carbonyl, and hydroxyl stretching vibrations, respectively. These features confirm the structural integrity of the complexes while also suggesting the presence of hydrogen bonding or molecular rearrangements.

Moreover, variations in the 1505 cm⁻¹ region, corresponding to N—H deformation vibrations, indicate possible interactions involving amine groups, further supporting the involvement of multiple functional groups in the coordination process.

The IR spectra of equimolar systems (Fig. S2) as well as those with a two-fold excess of amoxicillin (Fig. S3) are provided in the

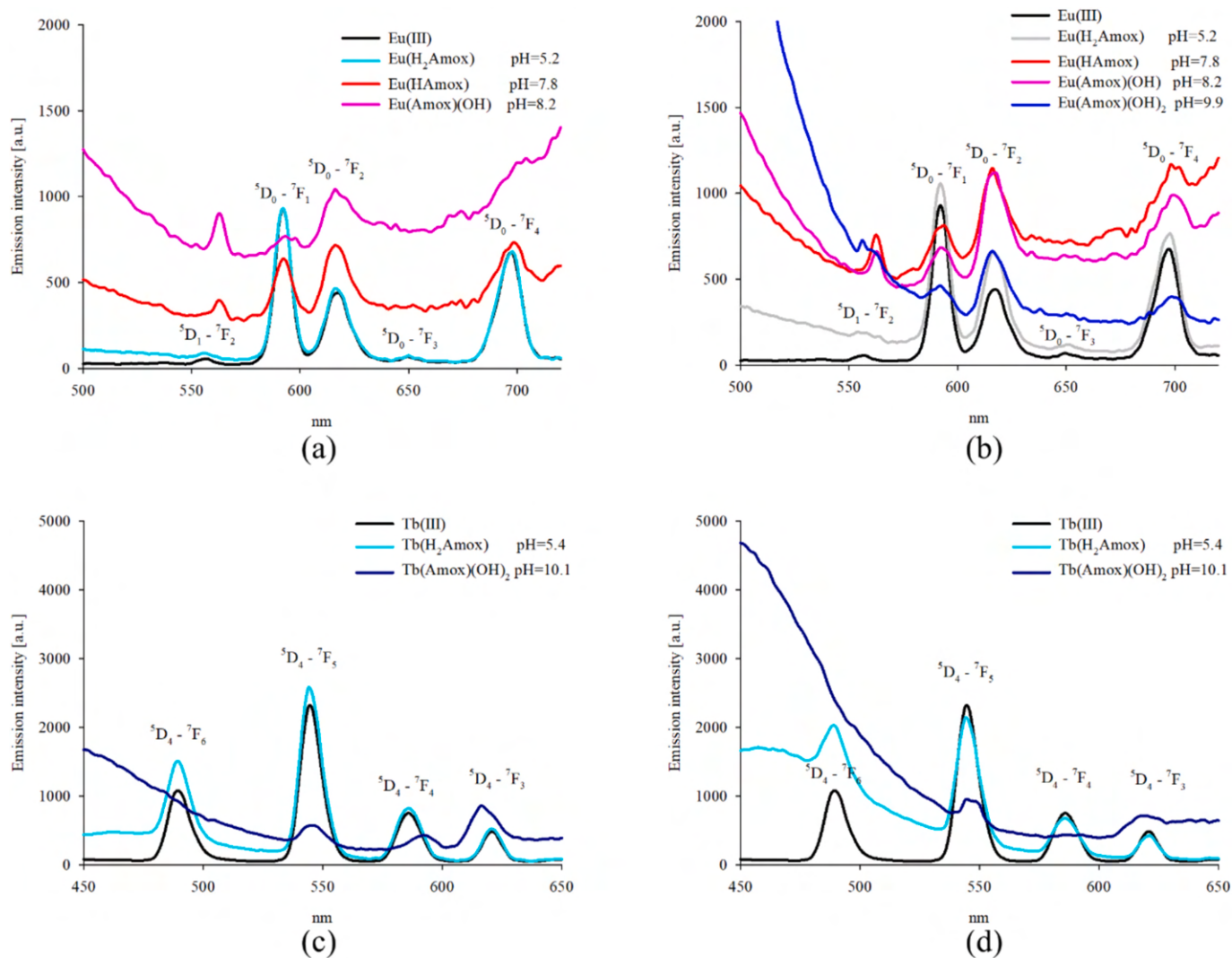


Fig. 7. Emission spectra of the systems: (a) Eu(III)/Amoxicillin (1:1 ratio); (b) Eu(III)/Amoxicillin (1:2 ratio); (c) Tb(III)/Amoxicillin (1:1 ratio); (d) Tb(III)/Amoxicillin (1:2 ratio).

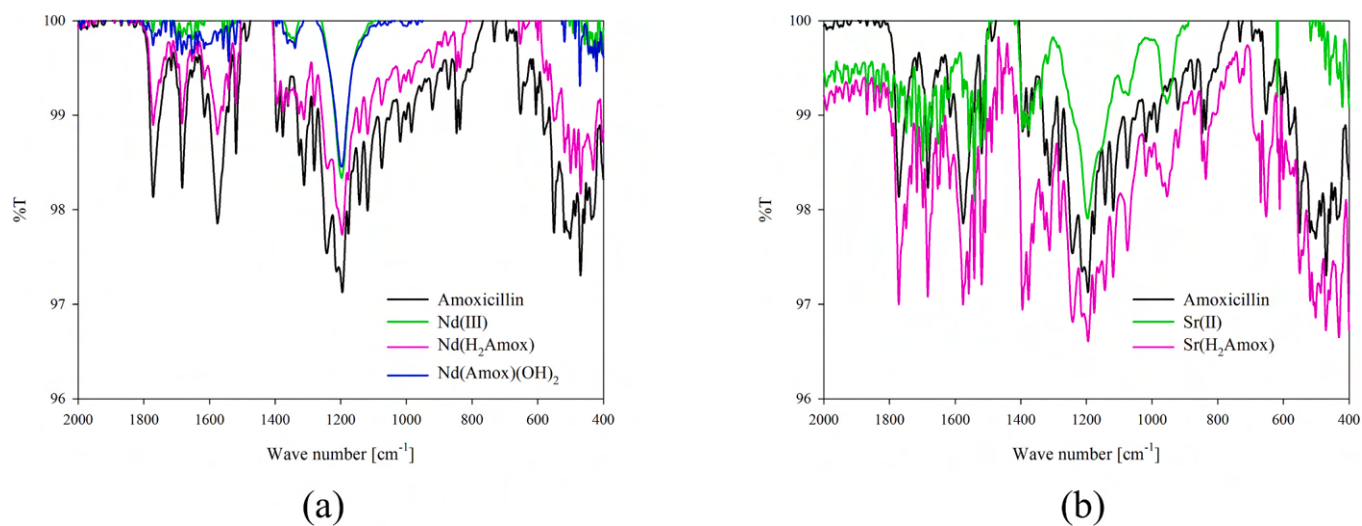


Fig. 8. IR spectra of the systems: (a) Nd(III)/Amoxicillin (1:1 ratio); (b) Sr(II)/Amoxicillin (1:2 ratio).

Supplementary Materials.

3.8. Correlation between thermodynamic stability and spectroscopic features

The thermodynamic stability constants obtained from potentiometric measurements show a clear correlation with the spectroscopic behavior observed across the s-, d-, and f-block metal ions. In the case of s-block metals (Mg(II), Ca(II), Sr(II)), relatively low $\log \beta$ values and the predominance of protonated $M(H \times Amox)$ species are consistent with weak metal–ligand interactions and only subtle spectroscopic changes. These systems do not exhibit diagnostic d–d transitions in UV–Vis spectra, and the observed IR shifts are minor, reflecting limited perturbation of the ligand electronic structure.

In contrast, d-block metals (Co(II), Ni(II), Cu(II)) display significantly higher stability constants and more complex speciation, which is mirrored by pronounced spectroscopic effects. Clear pH-dependent shifts of d–d transitions in UV–Vis spectra indicate changes in ligand field strength and coordination geometry, while Cu(II) complexes additionally show characteristic variations in EPR parameters, confirming stronger and more diverse coordination modes associated with higher thermodynamic stability.

For f-block metals (Nd(III), Eu(III), Tb(III)), the stability constants are comparable to or higher than those of s-block metals, but the coordination behavior is dominated by hydroxo species formation. The luminescence spectra of Eu(III) and Tb(III) complexes correlate well with the calculated speciation models, with changes in emission intensity reflecting ligand deprotonation and modifications of the metal coordination environment.

Overall, an increase in thermodynamic stability is consistently accompanied by more pronounced spectroscopic perturbations, demonstrating a coherent relationship between potentiometric data and spectroscopic observations across all three metal blocks.

4. Conclusions

The formation of binary complexes between amoxicillin and selected metal ions has been extensively studied and confirmed. In equimolar systems, complexes containing a single coordinated amoxicillin molecule were identified, whereas in the presence of a twofold excess of the antibiotic, two ligand molecules were incorporated into the coordination sphere.

With increasing pH, the system transitioned from protonated species to simple complexes, eventually leading to the formation of hydroxy complexes. The complexation process and the structural organization of the coordination sphere were analyzed using multiple spectroscopic techniques, including electron paramagnetic resonance (EPR), ultraviolet-visible (UV–Vis), and infrared (IR) spectroscopy. These studies, conducted under different pH conditions, allowed observation of coordination environment changes resulting from ligand deprotonation.

EPR spectroscopy confirmed the presence of mononuclear copper(II) complexes. UV–Vis spectroscopy revealed characteristic d–d electronic transitions, with absorption bands shifting toward either higher or lower wavelengths depending on the metal ion and pH, indicating modifications in the ligand field. IR spectroscopy further supported the involvement of amoxicillin functional groups in metal coordination, confirming structural rearrangements.

The stoichiometries derived from the potentiometric modelling are fully consistent with the spectroscopic observations. Characteristic changes in UV–Vis and EPR spectra, together with the luminescence profiles of Eu(III) and Tb(III) complexes, clearly differentiate mono- from bis-ligand species, providing independent confirmation of the formation of 1:1 and 1:2 complexes under the studied conditions.

Furthermore, comparison of the potentiometric and spectroscopic results allows a concise assessment of the donor atoms involved in metal

coordination. The s-block ions favour binding through the carboxylate oxygen, whereas Co(II) and Ni(II) preferentially form O,O-coordinated complexes with limited involvement of nitrogen donors. In contrast, Cu(II) exhibits mixed N/O coordination, consistent with its characteristic EPR parameters, while the lanthanide ions coordinate predominantly via carboxylate oxygen atoms. These trends reflect the interplay between metal-ion hardness and ligand deprotonation. Overall, these findings emphasize the pH-dependent nature of formation of complex compounds of amoxicillin with various metal ions and the dynamic changes in the coordination sphere, which influence complex stability and formation under varying conditions.

CRediT authorship contribution statement

Justyna Frymark: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Project administration, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Michał Zabizsak:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Kazuma Ogawa:** Writing – review & editing, Formal analysis. **Renata Jastrzab:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Methodology, Funding acquisition.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.129190>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] H.H. Handsfield, H. Clark, J.F. Wallace, K.K. Holmes, M. Turck, Amoxicillin, a new penicillin antibiotic, *Antimicrob. Agents Chemother.* 3 (1973) 262–265, <https://doi.org/10.1128/AAC.3.2.262>.
- [2] K.K. Sodhi, M. Kumar, D.K. Singh, Insight into the amoxicillin resistance, ecotoxicity, and remediation strategies, *J. Water Process Eng.* 39 (2021) 101858, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101858>.
- [3] B.J. Akhavan, N.R. Khanna, P. Vijhiani, Amoxicillin. [Updated 2023 Nov 17], in: StatPearls [Internet], StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482250/>.
- [4] Merck, The Merck veterinary manual/antibacterial agents. http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antibacterial_agents/penicillins.html, 2016.
- [5] R.N. Brogden, T.M. Speight, G.S. Avery, Amoxycillin: a review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use, *Drugs* 9 (1975) 88–140, <https://doi.org/10.2165/00003495-197509020-00002>.
- [6] K.R. Comber, R.J. Boon, R. Sutherland, Comparative effects of Amoxycillin and ampicillin on the morphology of *Escherichia coli* in vivo and correlation with activity, *Antimicrob. Agents Chemother.* 12 (1977) 736–744, <https://doi.org/10.1128/AAC.12.6.736>.
- [7] Q. Yao, L. Gao, T. Xu, Y. Chen, X. Yang, M. Han, X. He, C. Li, R. Zhou, Y. Yang, Amoxicillin administration regimen and resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus* established in tissue cage infection model, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1638, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01638>.
- [8] C.N. Wivagg, R.P. Bhattacharyya, D.T. Hung, Mechanisms of β -lactam killing and resistance in the context of mycobacterium tuberculosis, *J. Antibiot.* 67 (2014) 645–654, <https://doi.org/10.1038/ja.2014.94>.
- [9] S. Giguère, Antimicrobial drug action and interaction: An introduction, in: S. Giguère, J.F. Prescott, P.M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary*

- Medicine, 1st ed, Wiley, 2013, pp. 1–10, <https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch1>.
- [10] S. Sharma, A. Chauhan, A. Ranjan, D.M. Mathkor, S. Haque, S. Ramniwas, H. S. Tuli, T. Jindal, V. Yadav, Emerging challenges in antimicrobial resistance: implications for pathogenic microorganisms, novel antibiotics, and their impact on sustainability, *Front. Microbiol.* 15 (2024) 1403168, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1403168>.
 - [11] Md.A. Salam, Md.Y. Al-Amin, M.T. Salam, J.S. Pawar, N. Akhter, A.A. Rabaan, M. A.A. Alqumber, Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health, *Healthcare* 11 (2023) 1946, <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>.
 - [12] F. Prestinaci, P. Pezzotti, A. Pantosti, Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon, *Pathogens Global Health* 109 (2015) 309–318, <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>.
 - [13] C.J.L. Murray, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis, *Lancet* 399 (2022) 629–655. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
 - [14] M. Naddaf, 40 million deaths by 2050: toll of drug-resistant infections to rise by 70%, *Nature* 633 (2024) 747–748, <https://doi.org/10.1038/d41586-024-03033-w>.
 - [15] M.E.A. De Kraker, A.J. Stewardson, S. Harbarth, Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS Med.* 13 (2016) e1002184 <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>.
 - [16] A. Manesh, G.M. Varghese, Rising antimicrobial resistance: an evolving epidemic in a pandemic, *The Lancet Microbe* 2 (2021) e419–e420, [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00173-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00173-7).
 - [17] U. Hofer, The cost of antimicrobial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (2019) 3, <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0125-x>.
 - [18] S. Gandra, K.K. Tseng, A. Arora, B. Bhowmik, M.L. Robinson, B. Panigrahi, R. Laxminarayan, E.Y. Klein, The mortality burden of multidrug-resistant pathogens in India: a retrospective, observational study, *Clin. Infect. Dis.* 69 (2019) 563–570, <https://doi.org/10.1093/cid/ciy955>.
 - [19] D. Van Duin, D.L. Paterson, Multidrug-resistant bacteria in the community, *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 30 (2016) 377–390, <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>.
 - [20] H. Alaoui Mdarhri, R. Benmessaoud, H. Yacoubi, L. Seffar, H. Guennouni Assimi, M. Hamam, R. Boussettine, N. Filali-Ansari, F.A. Lahlou, I. Diawara, M.M. Ennaji, M. Kettani-Halabi, Alternatives therapeutic approaches to conventional antibiotics: advantages, limitations and potential application in medicine, *Antibiotics* 11 (2022) 1826, <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121826>.
 - [21] G.D. Wright, A.D. Sutherland, New strategies for combating multidrug-resistant bacteria, *Trends Mol. Med.* 13 (2007) 260–267, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.04.004>.
 - [22] B. Singha, V. Singh, V. Soni, Alternative therapeutics to control antimicrobial resistance: a general perspective, *Front. Drug Discov.* 4 (2024) 1385460, <https://doi.org/10.3389/fddsv.2024.1385460>.
 - [23] M. Mora-Ochomogo, C.T. Lohans, β -Lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: from covalent inhibitors to substrates, *RSC Med. Chem.* 12 (2021) 1623–1639, <https://doi.org/10.1039/D1MD00200G>.
 - [24] M. Miethke, et al., Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics, *Nat. Rev. Chem.* 5 (2021) 726–749, <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>.
 - [25] M.S. Butler, W. Vollmer, E.C.A. Goodall, R.J. Capon, I.R. Henderson, M.A. T. Blaskovich, A review of antibacterial candidates with new modes of action, *ACS Infect. Dis.* 10 (2024) 3440–3474, <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00218>.
 - [26] J. Murugaiyan, et al., Progress in alternative strategies to combat antimicrobial resistance: focus on antibiotics, *Antibiotics* 11 (2022) 200, <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020200>.
 - [27] J.F. Fisher, S.O. Meroueh, S. Mobashery, Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity, *Chem. Rev.* 105 (2005) 395–424, <https://doi.org/10.1021/cr030102i>.
 - [28] M. Zabiszak, J. Frymark, K. Ogawa, M. Skrobańska, M. Nowak, R. Jastrzab, M. T. Kaczmarek, Complexes of β -lactam antibiotics and their Schiff-base derivatives as a weapon in the fight against bacterial resistance, *Coord. Chem. Rev.* 493 (2023) 215326, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215326>.
 - [29] A. Frei, Metal complexes, an untapped source of antibiotic potential? *Antibiotics* 9 (2020) 90, <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020090>.
 - [30] A. Hrioua, A. Loudiki, A. Farahi, F. Laghib, M. Bakasse, S. Lahrich, S. Saqrane, M. A. El Mhammedi, Complexation of amoxicillin by transition metals: Physico-chemical and antibacterial activity evaluation, *Bioelectrochemistry* 142 (2021) 107936, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107936>.
 - [31] F.I. Eze, U. Ajali, P.O. Ukoha, Synthesis, physicochemical properties, and antimicrobial studies of Iron (III) complexes of ciprofloxacin, cloxacillin, and amoxicillin, *Int. J. Med. Chem.* 2014 (2014) 1–6, <https://doi.org/10.1155/2014/735602>.
 - [32] A. Cipurković, S. Marić, E. Horozić, D. Husejnagić, S. Cipurković, Copper (II) complexes with some antibiotics: synthesis, FT-IR study and in vitro antibacterial activity, *IJAC* 11 (2023) 10–14, <https://doi.org/10.14419/ijac.v11i1.32251>.
 - [33] B. Božić, J. Korać, D.M. Stanković, M. Stanić, M. Romanović, J.B. Pristov, S. Spasić, A. Popović-Bijelić, I. Spasojević, M. Bajčetić, Coordination and redox interactions of β -lactam antibiotics with Cu^{2+} in physiological settings and the impact on antibacterial activity, *Free Radic. Biol. Med.* 129 (2018) 279–285, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.038>.
 - [34] J.R. Anacona, Synthesis and antibacterial activity of some metal complexes of beta-lactamic antibiotics, *J. Coord. Chem.* 54 (2001) 355–365, <https://doi.org/10.1080/00958970108022648>.
 - [35] A.M. Abbas, S.R. Faisal, A.S. Orabi, Novel β -lactam antibiotic derivative and its complexes: DFT, frontier energy levels, DNA interaction, docking, physicochemical and antimicrobial properties, *J. Mol. Struct.* 1218 (2020) 128487, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128487>.
 - [36] R.J. Turner, The good, the bad, and the ugly of metals as antimicrobials, *Biomaterials* 37 (2024) 545–559, <https://doi.org/10.1007/s10534-023-00565-y>.
 - [37] M. Moustakas, The role of metal ions in biology, biochemistry and medicine, *Materials* 14 (2021) 549, <https://doi.org/10.3390/ma14030549>.
 - [38] E.W. Ainscough, A.M. Brodie, The role of metal ions in proteins and other biological molecules, *J. Chem. Educ.* 53 (1976) 156, <https://doi.org/10.1021/ed053p156>.
 - [39] W. Maret, The metals in the biological periodic system of the elements: concepts and conjectures, *IJMS* 17 (2016) 66, <https://doi.org/10.3390/ijms17010066>.
 - [40] J.-C.G. Bünzli, Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging, *Chem. Rev.* 110 (2010) 2729–2755, <https://doi.org/10.1021/cr900362e>.
 - [41] C. Alexander, Z. Guo, P.B. Glover, S. Faulkner, Z. Pikramenou, Luminescent lanthanides in biorelated applications: from molecules to nanoparticles and diagnostic probes to therapeutics, *Chem. Rev.* 125 (2025) 2269–2370, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.4c00615>.
 - [42] M.R. Bahry, T.H. Al-Noor, A.M. Fardous, A.R. Heydari, A. Abdou, S. Fayez, M. El-Shazly, N. Saleh, Synthesis, characterization, and antimicrobial evaluation of Schiff base-mixed ligand complexes with divalent metal ions derived from amoxicillin and vanillin/nicotinamide, *CPD* 30 (2024) 1852–1866, <https://doi.org/10.2174/0113816128298883240509110406>.
 - [43] M. Moreno-Latorre, M.C. De La Torre, J.A. Cabeza, P. García-Álvarez, M.A. Sierra, Attaching metal-containing moieties to β -lactam antibiotics: the case of penicillin and cephalosporin, *Inorg. Chem.* 63 (2024) 12593–12603, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.4c01548>.
 - [44] J. Frymark, M. Zabiszak, J. Grajewski, Z. Hnatejko, D. Kolodyńska, M. T. Kaczmarek, R. Jastrzab, Excess of polyamine as a factor influencing the mode of coordination in the $\text{Eu(III)/}\alpha$ -hydroxy acid/spermine system, *Polyhedron* 221 (2022) 115853, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115853>.
 - [45] M. Zabiszak, J. Frymark, M. Nowak, J. Grajewski, K. Stachowiak, M.T. Kaczmarek, R. Jastrzab, Influence of d-Electron divalent metal ions in complex formation with L-tartaric and L-malic acids, *Molecules* 26 (2021) 5290, <https://doi.org/10.3390/molecules26175290>.
 - [46] J. Frymark, M. Zabiszak, J. Grajewski, B. Tylkowski, R. Jastrzab, Insights into complex compounds of ampicillin: potentiometric and spectroscopic studies, *Int. J. Mol. Sci.* 26 (2025) 7605, <https://doi.org/10.3390/ijms26157605>.
 - [47] L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species, *Coord. Chem. Rev.* 184 (1999) 311–318, [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00260-4](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00260-4).
 - [48] P.K. Glasoe, F.A. Long, Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide, *J. Phys. Chem.* 64 (1960) 188–190, <https://doi.org/10.1021/j100830a521>.
 - [49] F. Crea, D. Cucinotta, C. De Stefano, D. Milea, S. Sammartano, G. Vianelli, Modeling solubility, acid-base properties and activity coefficients of amoxicillin, ampicillin and (+)-6-aminopenicillanic acid, in NaCl(aq) at different ionic strengths and temperatures, *Eur. J. Pharm. Sci.* 47 (2012) 661–677, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.08.005>.
 - [50] V.G. Alekseev, E.V. Demskaya, E.A. Milashs, V.V. Igolkin, Acid-Base properties of Amoxycillin, *Russ. J. Gen. Chem.* 75 (2005) 1147–1150, <https://doi.org/10.1007/s11176-005-0383-y>.
 - [51] B.J. Hathaway, D.E. Billing, The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion, *Coord. Chem. Rev.* 5 (1970) 143–207, [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80135-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80135-6).

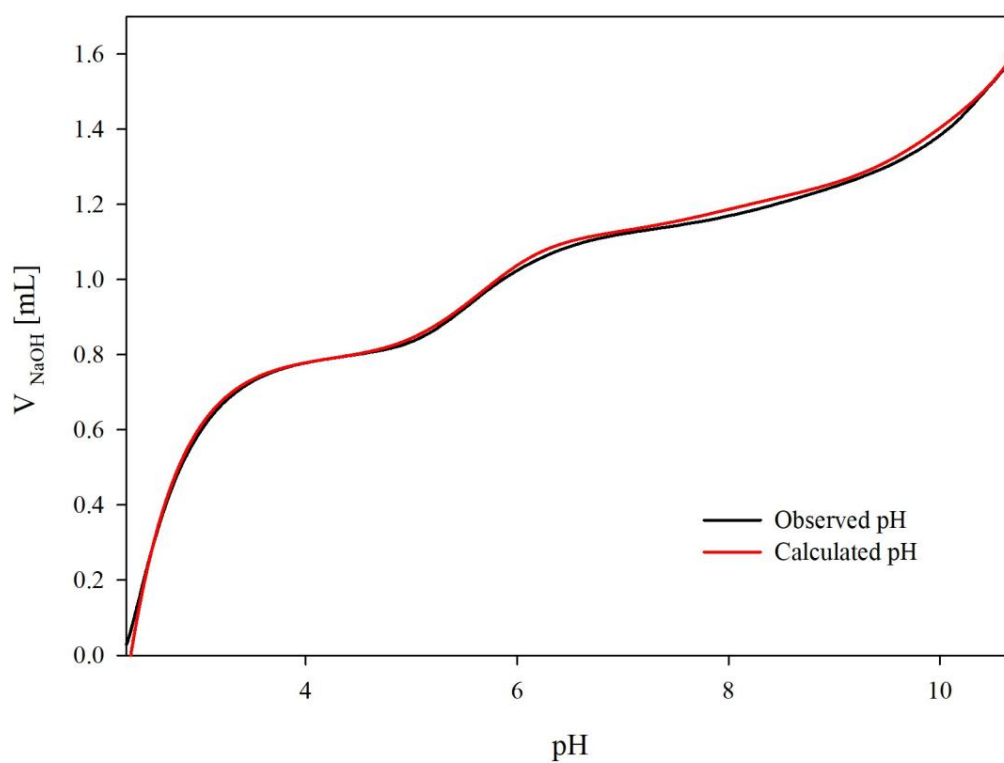


Figure S1. An example comparison of the theoretical curve with the experimental curve confirming the correctness of the selected set of complex compounds for system Cu(II)/Amoxicillin 1:1.

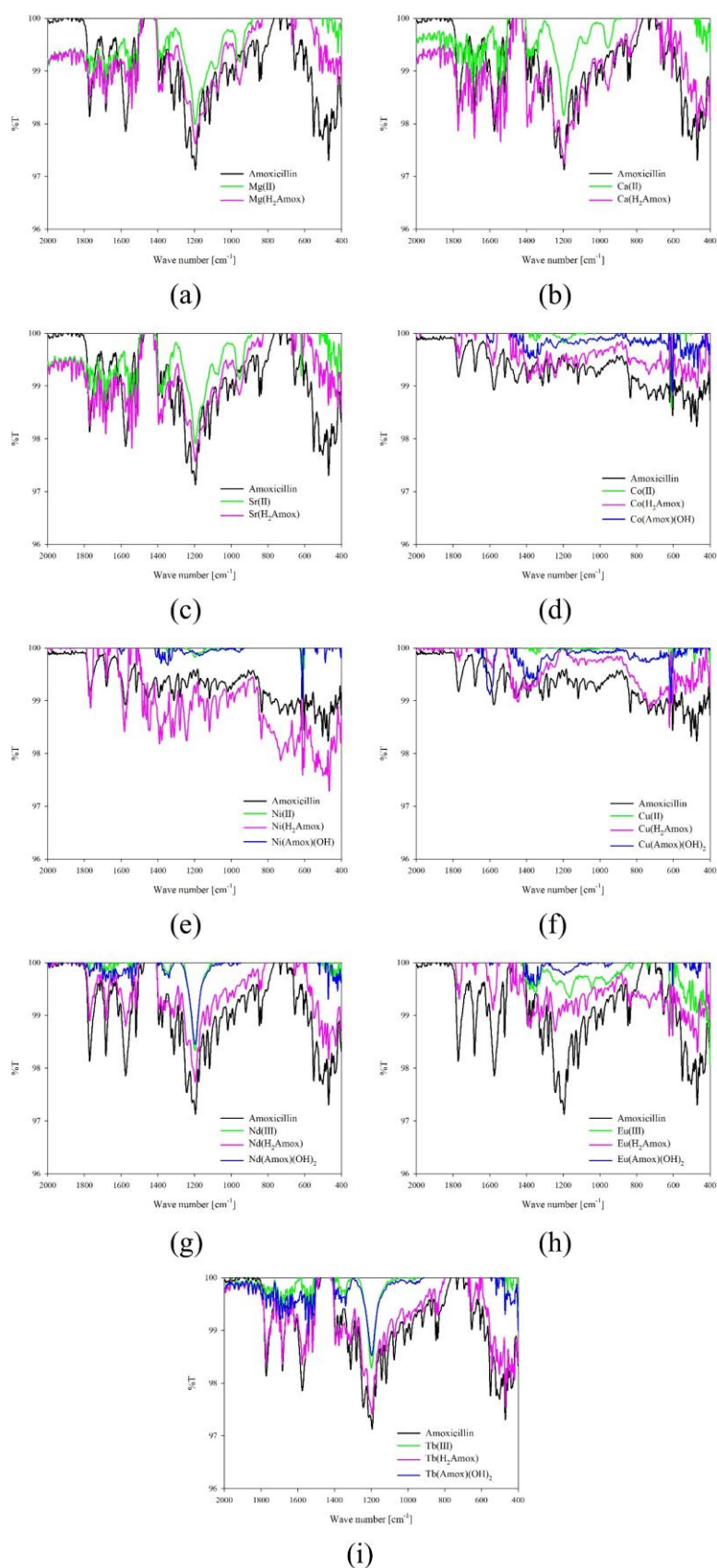


Figure S2. IR spectra of the equimolar systems: (a) Mg(II)/Amoxicillin; (b) Ca(II)/Amoxicillin; (c) Sr(II)/Amoxicillin; (d) Co(II)/Amoxicillin; (e) Ni(II)/Amoxicillin; (f) Cu(II)/Amoxicillin; (g) Nd(III)/Amoxicillin; (h) Eu(III)/Amoxicillin; (i) Tb(III)/Amoxicillin.

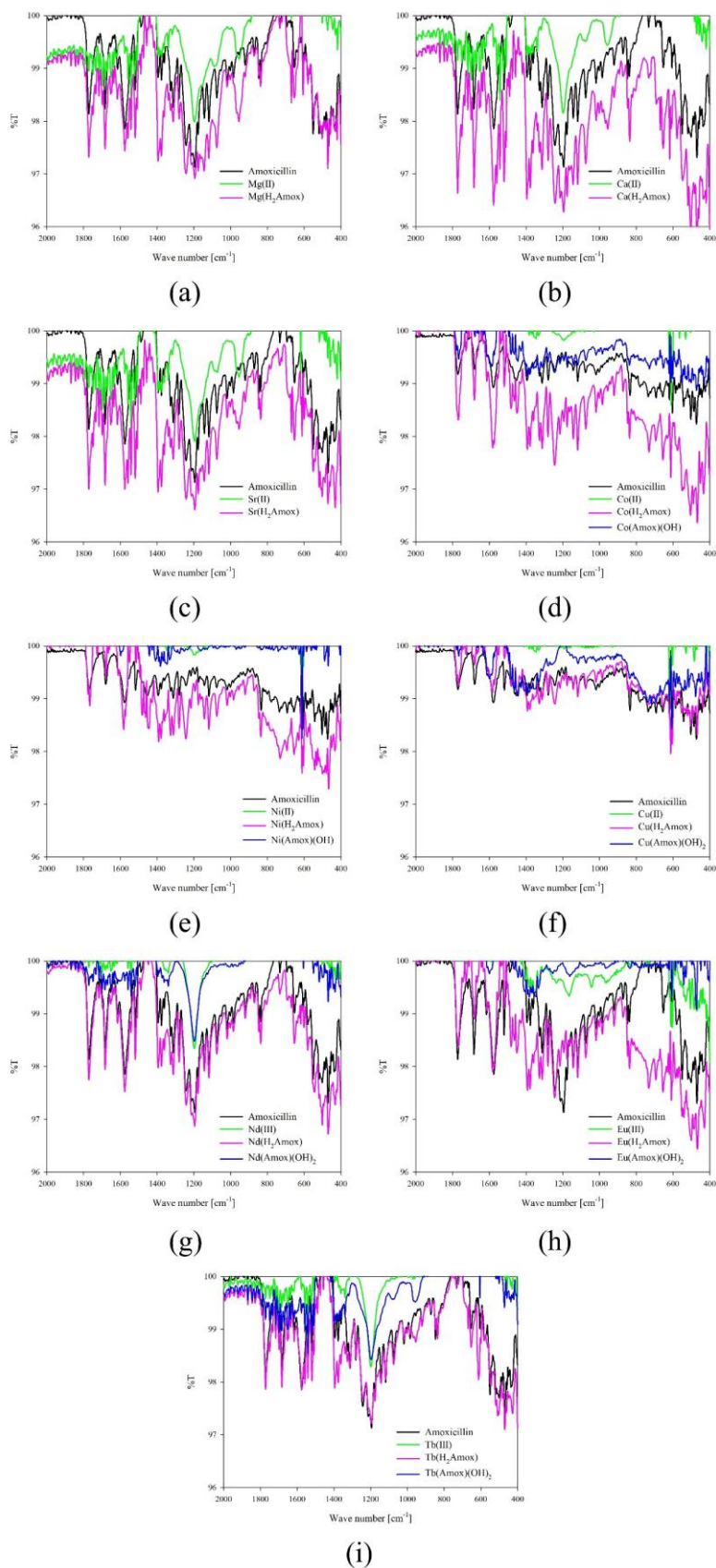


Figure S3. IR spectra of the twofold excess systems: (a) Mg(II)/Amoxicillin; (b) Ca(II)/Amoxicillin; (c) Sr(II)/Amoxicillin; (d) Co(II)/Amoxicillin; (e) Ni(II)/Amoxicillin; (f) Cu(II)/Amoxicillin; (g) Nd(III)/Amoxicillin; (h) Eu(III)/Amoxicillin; (i) Tb(III)/Amoxicillin.

Imię i nazwisko:

Justyna Frymark

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin, 2026, J. Mol. Liq. 444, 129190.

Autorzy publikacji:

Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Kazuma Ogawa, Renata Jastrząb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji "*Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin*" mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu badań eksperymentalnych, przeprowadzeniu analizy formalnej, zarządzaniu danymi badawczymi, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, udziale w redakcji i korekcie manuskryptu, opracowaniu wizualizacji wyników, sprawowaniu nadzoru nad realizacją badań oraz administracji projektem.

Poznań 26.04.2026

(miejsce i data)

Frymark

(podpis)

Imię i nazwisko:
dr Michał Zabiszak

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:
Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin, 2026, J. Mol. Liq. 444, 129190.

Autorzy publikacji:
Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Kazuma Ogawa, Renata Jastrząb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji "*Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin*" mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, współtworzeniu metodologii badań, udziale w walidacji wyników, przeprowadzeniu analizy formalnej, zarządzaniu danymi badawczymi, udziale w redakcji i korekcie manuskryptu, opracowaniu wizualizacji wyników oraz sprawowaniu nadzoru nad realizacją badań.

26.06.2026 Poznań

(miejsce i data)

Zabiszak

(podpis)



Name and surname:

Prof. Kazuma Ogawa

Publication title, year of publication, journal/publisher, volume, pages:

Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin, 2026, J. Mol. Liq. 444, 129190.

Authors of the publication:

Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Kazuma Ogawa, Renata Jastrząb

STATEMENT

I declare that my contribution to the publication "*Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin*" involved conducting a formal analysis and participating in the editing and revision of the manuscript.

Kanazawa, Japan.
..... 25th June 2026

(place and date)

(signature)

Imię i nazwisko:

Prof. dr hab. Renata Jastrzęb

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin, 2026, J. Mol. Liq. 444, 129190.

Autorzy publikacji:

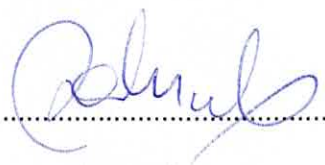
Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Kazuma Ogawa, Renata Jastrzęb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji "*Coordination chemistry of amoxicillin: potentiometric and spectroscopic characterization of complexes compounds of amoxicillin*" mój udział polegał na współtworzeniu metodologii badań, udziale w walidacji wyników, zapewnieniu zasobów do realizacji projektu, udziale w redakcji i korekcie manuskryptu, sprawowaniu nadzoru naukowego nad realizacją badań oraz pozyskaniu finansowania badań.

Poznań 26.06.2026

(miejsce i data)



(podpis)

- A3** **Frymark, J.*;** Zabiszak, M.; Kaczmarek, M. T.; Jastrz b, R.
Metal–Antibiotic Interactions: Potentiometric and Spectroscopic Investigation
of Cloxacillin and Dicloxacillin Complexes in Aqueous Solution. *Sci. Rep.*
2026.
<https://doi.org/10.1038/s41598-026-55267-5>
[IF =3,900, MNI SW = 140]

Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution

Received: 27 March 2026

Accepted: 22 May 2026

Published online: 30 May 2026

Cite this article as: Frymark J., Zabizak M., Kaczmarek M.T. *et al.* Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution. *Sci Rep* (2026). <https://doi.org/10.1038/s41598-026-55267-5>

Justyna Frymark, Michał Zabizak, Małgorzata T. Kaczmarek & Renata Jastrząb

We are providing an unedited version of this manuscript to give early access to its findings. Before final publication, the manuscript will undergo further editing. Please note there may be errors present which affect the content, and all legal disclaimers apply.

If this paper is publishing under a Transparent Peer Review model then Peer Review reports will publish with the final article.

© The Author(s) 2026. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Metal–Antibiotic Interactions: Potentiometric and Spectroscopic Investigation of Cloxacillin and Dicloxacillin Complexes in Aqueous Solution

Justyna Frymark^{1*}, Michał Zabiszak¹, Małgorzata T. Kaczmarek¹, Renata Jastrzab¹

¹ Adam Mickiewicz University in Poznań, Faculty of Chemistry, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland

* justyna.frymark@amu.edu.pl

Abstract

This study investigates the complexation of selected 3d transition metals (Co(II), Ni(II), Cu(II)) and lanthanide(III) ions (Nd(III), Eu(III), Tb(III)) with cloxacillin (Clox) and dicloxacillin (Diclox) in aqueous solution. The investigation combines potentiometric titrations and spectroscopic methods to provide insight into the coordination behavior of these isoxazolympenicillins. The results show that complex stability follows the order $\text{Co(II)} \approx \text{Ni(II)} < \text{Cu(II)}$ and increases along the lanthanide series $\text{Nd(III)} < \text{Eu(III)} < \text{Tb(III)}$. Dicloxacillin, containing two chlorine substituents in the isoxazoly ring, forms consistently more stable complexes than cloxacillin, indicating a noticeable effect of ligand substitution on metal binding. Speciation analysis indicates the formation of mono- and bis-ligand species at near-neutral pH and hydroxo-ligand complexes at higher pH. Spectroscopic data confirm coordination mainly via the deprotonated carboxylate group, with additional involvement of amide functionalities. The observed spectral changes are consistent with potentiometric models and indicate stronger interactions in dicloxacillin systems. These findings demonstrate that small structural differences between the ligands significantly affect metal binding and speciation, providing new insight into β -lactam-metal interactions.

Keywords: Cloxacillin, Dicloxacillin, metal ions, complex compounds, potentiometric measurements, spectroscopy studies

1. Introduction

The growing problem of antimicrobial resistance has intensified the search for new strategies to improve the efficacy of existing antibiotics, particularly those from the β -lactam group [1–4]. Among them, cloxacillin and dicloxacillin (Fig. 1), classified as isoxazolympenicillins, have been widely used due to their resistance to β -lactamases and their high activity against Gram-positive pathogens, especially *Staphylococcus aureus* [5–12]. These semisynthetic antibiotics exert their bactericidal effect by inhibiting peptidoglycan cross-linking in the bacterial cell wall, ultimately leading to cell lysis [13]. Their clinical utility has made them indispensable in the treatment of skin, respiratory, and bone infections caused by penicillinase-producing staphylococci [5,11,12].

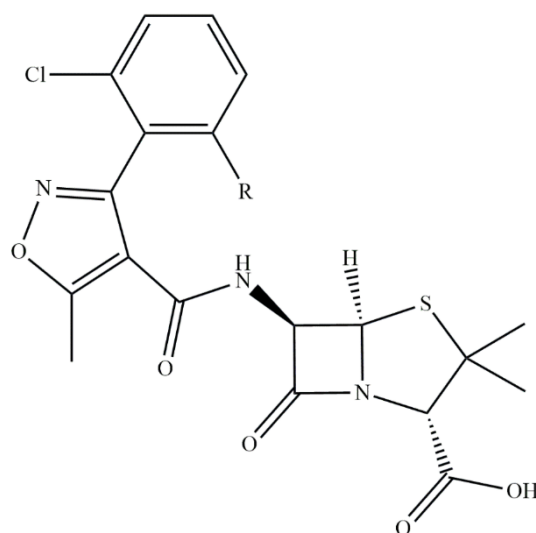


Figure 1. General structure of the isoxazolympenicillins, where $R = \text{H}$ for Cloxacillin and $R = \text{Cl}$ for Dicloxacillin.

Yet, the clinical success of these agents is increasingly threatened by the rapid evolution of resistant bacterial strains. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and other β -lactamase-producing organisms continue to undermine the efficacy of β -lactam antibiotics worldwide, driving the need to develop adjunct strategies to restore or enhance their antimicrobial activity [14–17]. In this context, chemical modification through metal complexation has emerged as a promising approach to overcome resistance mechanisms and expand the therapeutic potential of existing antibiotics [18–22].

The coordination of β -lactam antibiotics with metal ions can significantly affect their physicochemical and biological properties. Such complexation may enhance antibiotic stability, alter lipophilicity, modulate interactions with cellular targets, or protect the molecule from enzymatic degradation [19–22]. Moreover, certain metal ions themselves possess antimicrobial activity or can influence the activity of co-administered agents through synergistic effects [23–26]. These interactions are of particular interest for transition metals (e.g., Cu(II), Co(II), Ni(II)) and lanthanides (e.g., Nd(III), Eu(III), Tb(III)), selected due to their diverse coordination behavior and relevance in biological and environmental systems. Transition metals are known for forming structurally diverse complexes, whereas lanthanides provide insight into predominantly oxygen-donor coordination and hydrolysis-driven speciation [27–29].

Despite increasing interest in metal-antibiotic systems, the coordination behavior of isoxazolympenicillins such as cloxacillin and dicloxacillin remains insufficiently explored. In particular, systematic studies comparing their stability, speciation, and coordination modes with both d- and f-block metal ions in aqueous solution are still lacking. A deeper understanding of these interactions is essential, as metal complexation may influence not only the physicochemical properties of antibiotics but also their biological performance, potentially contributing to improved efficacy or modulation of resistance mechanisms. The aim of this study is to provide a systematic and comparative analysis of the coordination behavior of cloxacillin and dicloxacillin with selected d- and f-block metal ions in aqueous solution. Particular attention is given to differences in stability constants, speciation, and coordination modes in order to evaluate the effect of ligand structure and metal ion type on

complex formation. Understanding the behavior of cloxacillin and dicloxacillin in the presence of metal ions contributes not only to the field of coordination chemistry but also offers potential implications for the design of novel therapeutic strategies involving metal-based drug systems.

In this context, the coordination behavior of the studied systems was investigated using a combination of potentiometric and spectroscopic techniques. Potentiometric titrations were employed to determine protonation and stability constants and to establish speciation models of the metal-ligand systems in aqueous solution. Complementary spectroscopic methods, including UV-Vis, FT-IR, and luminescence spectroscopy, were used to provide insight into the coordination environment and to identify the functional groups involved in metal binding. This combined approach enables a comprehensive characterization of both the thermodynamic and structural aspects of the investigated complexes.

2. Material and methods

2.1. Materials

Cloxacillin sodium monohydrate and dicloxacillin sodium monohydrate ($\geq 95\%$) were purchased from Merck and used without further purification. Nitrates of Cu(II), Ni(II), Co(II), Nd(III), Eu(III), and Tb(III) (analytical grade, $>99\%$) were also obtained from Merck and used as received. All solutions were prepared using carbonate-free deionized water with a conductivity of $0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$, obtained from a Simplicity Ultrapure Water System (Millipore, Darmstadt, Germany).

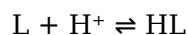
2.2. Equilibrium study

Potentiometric titrations were carried out using a Titrand 905 system (Metrohm, Herisau, Switzerland) equipped with an autoburette and combined glass electrode (model 6.0280.300). Prior to each set of titrations, the electrode was calibrated using standard buffer solutions (pH 4.0 and 9.0). In addition, a calibration titration was performed using a standardized strong acid solution (HCl, ca. 0.1 M) to verify the electrode response under the exact experimental conditions. The ionic strength was kept constant at 0.1 M KNO_3 . The titrations were performed under a helium atmosphere (Ultra High Purity 5.0; Linde Gaz, Kraków, Poland) to exclude atmospheric CO_2 . A CO_2 -free NaOH solution (ca. 0.2 M) was used as the titrant, added in 0.004 L increments. The exact concentrations of the HCl and NaOH solutions were determined prior to the titrations.

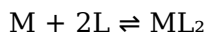
All measurements were conducted at a constant temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Binary metal-antibiotic systems were studied at metal-to-ligand molar ratios of 1:1 and 1:2, which were analyzed separately to ensure reliable identification of species and improve model robustness, with a ligand concentration of 0.001 M . Stability constants and protonation constants were calculated using the HYPERQUAD 2008 program (Hyperquad Ltd., Leeds, UK) [30]. Distribution diagrams were generated using the HySS (Hyperquad Simulation and Speciation) software [31]. Hydrolysis constants for the metal ions and the water ionic product ($\text{pK}_w = 13.77$) were adopted from previous studies [32-36].

To facilitate interpretation of the reported stability and protonation constants, the general equilibria considered in this study are summarized below.

The protonation of the ligand was described by the following equilibrium:



The formation of metal-ligand complexes was expressed using overall (cumulative) equilibria:

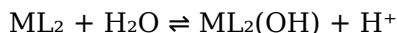
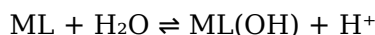
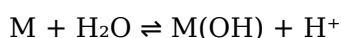


For systems involving protonated species, equilibria of the type:



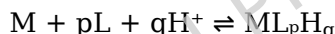
were also taken into account.

The formation of hydrolytic species was described by equilibria involving water:

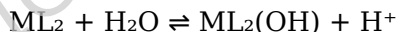


and, where appropriate, further hydrolysis steps were included.

The overall stability constants ($\log\beta$) refer to the cumulative equilibria defined according to the general expression:



The corresponding stepwise or conditional equilibrium constants ($\log K_e$), reported for selected reactions, were derived from differences between appropriate overall constants. For example, for the hydrolysis reaction:



the equilibrium constant was calculated as:

$$\log K_e = \log\beta(ML_2(OH)) - \log\beta(ML_2) - \log\beta(OH^-)$$

All constants were obtained by fitting potentiometric data using the Hyperquad 2008 program. The adopted model includes both complex formation and hydrolysis processes and ensures internal consistency of the calculated equilibrium parameters.

2.3. UV-Vis spectroscopy

Electronic absorption spectra were recorded at room temperature on an Evolution 300 UV-Vis spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Madison, WI, USA) equipped with a xenon lamp. Spectra were acquired in the 340–1000 nm range using Plastibrand PMMA cuvettes (1 cm path length). Solutions contained 0.001 M metal ions and metal-to-ligand ratios of 1:1 and 1:2. Baseline correction was performed using blank solutions prepared under identical experimental conditions.

2.4. Luminescence spectroscopy

Luminescence emission spectra for lanthanide complexes (Eu(III) and Tb(III)) were recorded using an RF-6000 spectrofluorophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) with excitation

wavelengths of 395 nm and 370 nm, respectively. Slit widths were set to 5 nm. The metal ion concentration was 0.001 M. Absorbance of solutions at excitation wavelengths was maintained below 0.2 absorbance units.

2.5. Infrared spectroscopy (FT-IR)

FT-IR spectra were recorded on an INVENIO R spectrophotometer (Bruker, Bremen, Germany). Samples were prepared by dissolving cloxacillin or dicloxacillin with the corresponding metal nitrates in D₂O at a concentration of 0.01 M for the metal ions. The metal-to-ligand molar ratios were 1:1 and 1:2. pH values were adjusted using NaOD or DCl, and corrected for deuterium isotope effect using the formula $pD = pH \text{ meter reading} + 0.4$ [37].

3. Results and Discussion

This research involved the determination of successive protonation constants for cloxacillin and dicloxacillin using potentiometric titration. The obtained values were $pK_a = 2.29(1)$ for cloxacillin and $pK_a = 3.55(1)$ for dicloxacillin. These values describe the dissociation of the carboxyl group in the β -lactam antibiotics studied, occurring at relatively low pH (Figure 2). Comparison of the pK_a values indicates that dicloxacillin is less acidic than cloxacillin, which may be attributed to a combination of electronic and steric effects. Although chlorine substituents are electron-withdrawing, their presence introduces steric and conformational constraints that may reduce effective stabilization of the deprotonated carboxylate group, particularly through altered solvation and possible intramolecular interactions. It is a balance between electronic effects and the local environment of the carboxyl group. Although chlorine substituents are electron-withdrawing, their influence is not directly transmitted to the carboxylate group and may be offset by conformational and solvation effects.

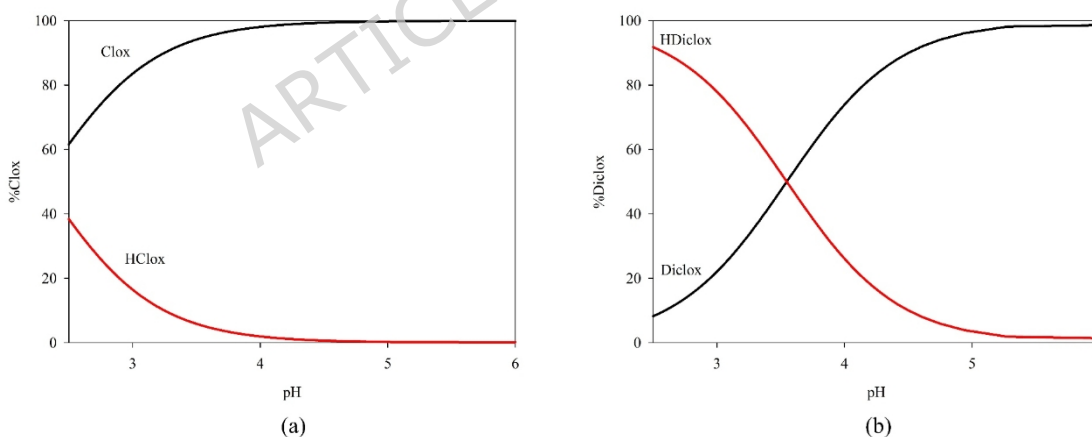


Figure 2. Distribution diagram of (a) Cloxacillin; (b) Dicloxacillin (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.001 \text{ M}$; $I = 0.1 \text{ M (KNO}_3\text{)}$; $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.1. Equilibrium study of d-block elements

A systematic study on the complexation of Co(II), Ni(II), and Cu(II) ions with cloxacillin was undertaken using equimolar and with a two-fold excess of the ligand titrations. From the experimental results, both the overall stability constants ($\log\beta$) of the complexes and the

equilibrium constants for their formation ($\log K_e$) were calculated. The obtained values, summarized in Table 1, allow for a comparative assessment of the stability trends across the studied metal ions. Distribution diagrams for the investigated systems are presented in Figure 3, illustrating the pH-dependent distribution of species and highlighting differences related to metal ion identity and ligand stoichiometry.

For the Co(II) system (Figure 3a-b), in equimolar conditions, partially deprotonated species Co(HClox) occurs at low pH, whereas Co(Clox) predominates across the mid-pH range. A residual fraction of free Co(II) (about 40%) remains present, and at alkaline pH the system is dominated by Co(OH)₂. Under ligand-excess conditions, the speciation becomes more complex, with the formation of polynuclear species such as Co₂(HClox)(Clox) and Co(HClox) at low pH, followed by the appearance of Co₂(Clox), which dominated in system, with accounting for approximately 80% of cobalt ions. In the slightly alkaline region Co(OH)₂ predominates with the coexistence of the form Co(Clox)(OH)₃.

In the case of Ni(II) (Figure 3c-d), the equimolar system is dominated by Ni(Clox) over a wide pH range, while Ni(HClox) is relevant only at low pH. Above pH 9.0, Ni(OH)₂ becomes the major species, indicating a limited contribution from hydroxo-ligand forms. With ligand excess, Ni(Clox) remains the predominant species, and although minor amounts of Ni(Clox)(OH) appear in the slightly alkaline region, hydroxide species ultimately dominate at high pH, above pH 9.0.

The Cu(II) system (Figure 3e-f) exhibits the most complex speciation pattern. Under equimolar conditions, free Cu(II) is predominant at low pH, while at intermediate pH values the bis-ligand complex, first, Cu(Hclox)(Clox) and then Cu(Clox)₂ are formed. At higher pH (above pH 7.0), mixed hydroxocomplexes such as Cu(Clox)₂(OH) and Cu(Clox)₂(OH)₂ appear, followed by the dominance of Cu(OH)₂ under strongly basic conditions.

In the system with ligand excess, copper exhibits a broader range of complex formation: Cu(Clox)₂ dominates near neutral pH, while at higher pH values, species such as Cu(Clox)₃(OH) emerge, delaying complete hydrolysis until strongly basic conditions.

Table 1. The overall stability constants ($\log \beta$) and the stepwise formation constants ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with cloxacillin and d-block elements (standard deviations are given in parentheses).

	Species	Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
		$\log \beta$	$\log K_e$	$\log \beta$	$\log K_e$	$\log \beta$	$\log K_e$
1:1	M(HClox)(Clox)	-	-	-	-	9.29(5)	6.99
	M(Clox) ₂	-	-	-	-	6.08(5)	6.08
	M(HClox)	6.02(5)	3.72	6.58(5)	4.29	-	-
	M(Clox)	3.52(1)	3.52	4.33(1)	4.33	-	-
	M(Clox) ₂ (OH)	-	-	-	-	0.07(3)	7.76
	M(Clox) ₂ (OH) ₃	-	-	-	-	15.86(4)	11.60
1:2	M(HClox)	6.02(5)	3.72	6.58(5)	4.29	-	-
	M(Clox)	-	-	4.33(1)	4.33	-	-

M(Clox)(OH)	-	-	-5.89(6)	3.85	-	-
	-					
M(Clox)(OH) ₃	25.71(2)	15.60	-	-	-	-
	)					
M ₂ (HClox)	13.20(5)	10.90	-	-	-	-
	)					
M ₂ (Clox)	6.98(1)	6.98	-	-	-	-
M(Clox) ₂	-	-	-	-	6.10(8)	6.10
M(Clox) ₂ (OH)	-	-	-	-	0.24(4)	7.95

ARTICLE IN PRESS

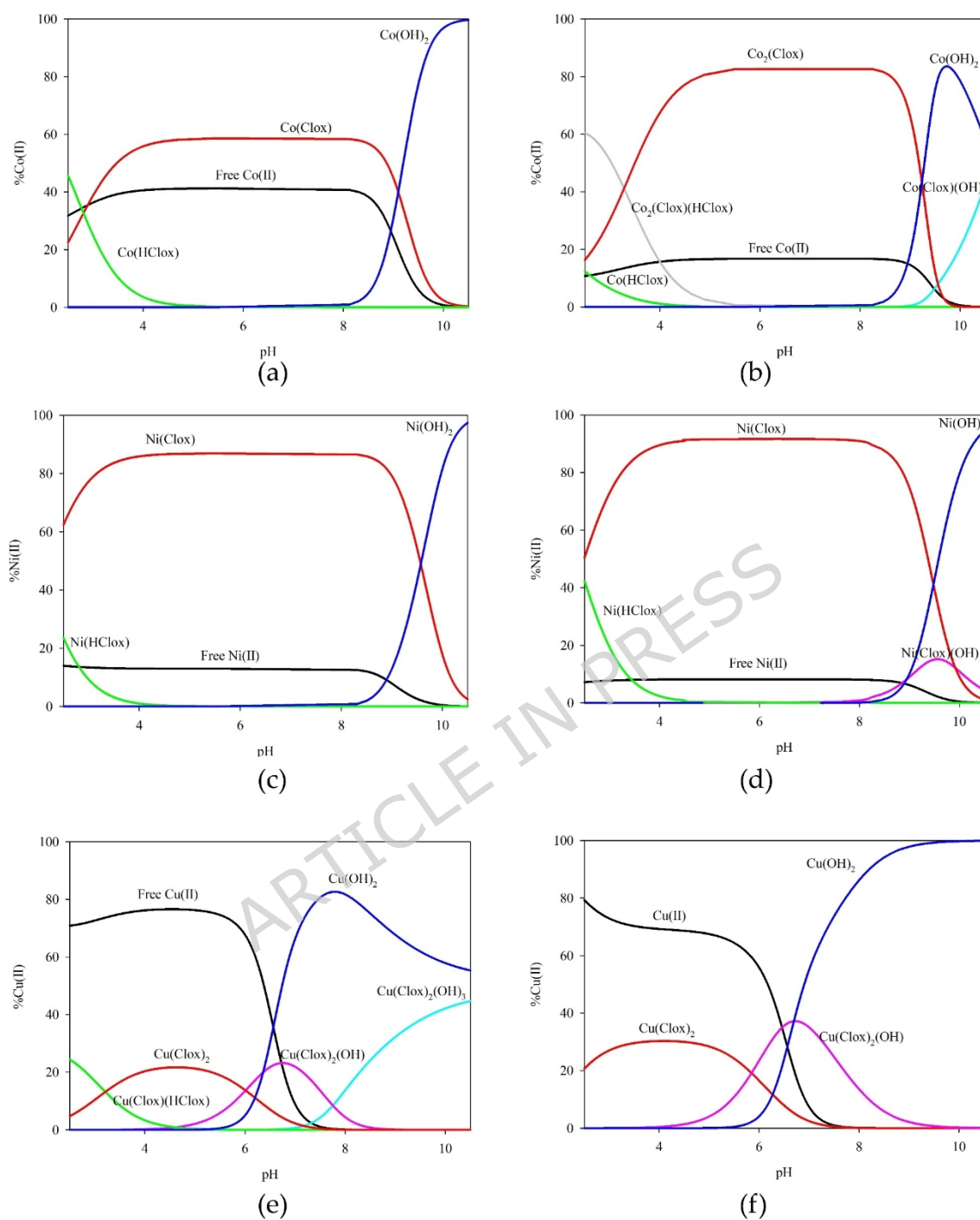


Figure 3. Distribution diagrams for the systems studied: (a) Co(II)/Cloxacillin (1:1 ratio); (b) Co(II)/Cloxacillin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/Cloxacillin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/Cloxacillin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/Cloxacillin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/Cloxacillin (1:2 ratio) (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.001 \text{ M}$; $C_{\text{Metal}} = 0.001 \text{ M}$ (1:1 systems) and 0.0005 M (1:2 systems); $I = 0.1 \text{ M}$ (KNO_3); $T = 20^\circ \text{C}$).

Following the potentiometric characterization of the Co(II), Ni(II), and Cu(II) systems with cloxacillin, an analogous study was carried out for dicloxacillin in order to enable a systematic comparison of the effect of ligand substitution on metal-ligand equilibria. The complexation of Co(II), Ni(II), and Cu(II) ions was investigated under equimolar metal-to-ligand conditions as well as in the presence of a two-fold excess of the ligand. On the basis of the experimental data, overall stability constants ($\log\beta$) and formation equilibrium constants ($\log K_e$) were determined. The calculated values, collected in Table 2, enable comparison of the stability of the complexes formed by the studied metal ions. The corresponding distribution diagrams are presented in Figure 4.

For the Co(II) system (Figure 4a-b), under equimolar conditions, partially protonated Co(HDiclox) species are present at low pH, while Co(Diclox) becomes the predominant form across the intermediate pH range. A significant fraction of free Co(II) remains present throughout this region. At alkaline pH, hydrolysis becomes dominant, leading to the formation of Co(OH)₂ as the major species. In the presence of excess ligand, the speciation becomes more complex. At low pH, Co(HDiclox)(Diclox) species are observed, followed by the dominance of the bis-ligand complex Co(Diclox)₂ over a wide pH range, accounting for approximately 80–85% of the cobalt content. In alkaline conditions, mixed hydroxo-ligand species Co(Diclox)₂(OH)₃ appear, accompanied by the formation of Co(OH)₂ at higher pH values.

For the Ni(II) system (Figure 4c-d), under equimolar conditions, Ni(Diclox) predominates over a broad pH range, while Ni(HDiclox) is relevant only at low pH. A noticeable fraction of free Ni(II) persists up to near-neutral pH. Above pH 9.0, hydrolysis becomes significant, with Ni(OH)₂ emerging as the dominant species, accompanied by minor contributions from Ni(Diclox)(OH). Under ligand-excess conditions, Ni(Diclox) remains the major species across the acidic and near-neutral pH range. In addition, the formation of Ni(Diclox)₂ becomes significant, contributing up to approximately 40% of the total nickel content. In the alkaline region, mixed hydroxo-ligand species Ni(Diclox)₂(OH) appear, followed by the gradual dominance of Ni(OH)₂ at higher pH values.

The most complex speciation behavior is exhibited by the Cu(II) system (Figure 4e-f). Under equimolar conditions, free Cu(II) dominates at low pH, but is progressively replaced by mixed hydroxo-ligand species such as Cu(Diclox)(OH), which becomes prominent in the intermediate pH range. With increasing pH, Cu(Diclox)(OH)₂ and Cu(OH)₂ emerge, with hydroxide species becoming dominant under strongly alkaline conditions.

In the presence of excess ligand, copper forms a variety of complexes. At low pH, Cu(HDiclox)(Diclox) and Cu(Diclox)₂ are observed, while at intermediate pH values mixed species such as Cu(Diclox)₂(OH) predominate. At higher pH, Cu(Diclox)₂(OH)₂ and Cu(OH)₂ become the major forms, indicating delayed hydrolysis compared to the equimolar system.

Table 2. The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with dicloxacillin and d-block elements (standard deviations are given in parentheses).

	Species	Co(II)		Ni(II)		Cu(II)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
$\frac{[L]}{[M]} = 1$	M(HDiclox)	6.58(3)	3.03	6.79(5)	3.24	-	-
	M(Diclox)	3.46(1)	3.46	4.23(5)	4.23	-	-

	M(Diclox)(OH)	-	-	-5.32(6)	8.45	-2.49(2)	11.28
	M(Diclox)(OH) ₂	-	-	-	-	-9.68(4)	17.87
1:2	M(HDiclox)(Diclox)	12.04(9)	8.49	-	-	10.71(5)	7.17
	M(Diclox) ₂	8.37(8)	8.37	7.83(6)	7.83	6.63(5)	6.63
	M(Diclox)	-	-	4.23(5)	4.23	-	-
	M(Diclox) ₂ (OH)	-	-	-0.97(9)	12.80	1.22(5)	14.99
	M(Diclox) ₂ (OH) ₂	10.05(9)	17.49	10.55(9)	16.99	-6.24(7)	21.30

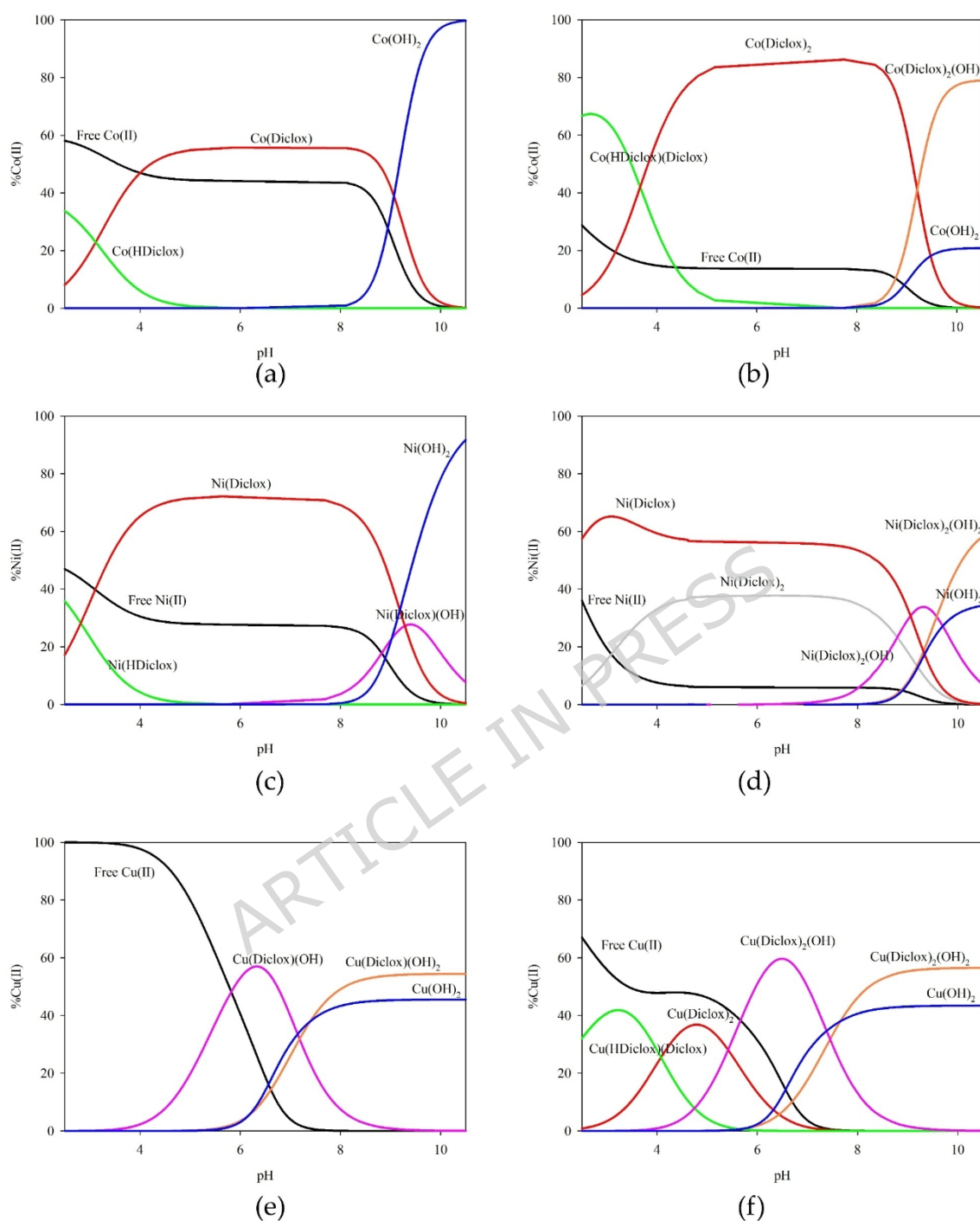


Figure 4. Distribution diagrams for the systems studied: (a) Co(II)/Dicloxacin (1:1 ratio); (b) Co(II)/Dicloxacin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/Dicloxacin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/Dicloxacin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/Dicloxacin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/Dicloxacin (1:2 ratio) (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.001 \text{ M}$; $C_{\text{Metal}} = 0.001 \text{ M}$ (1:1 systems) and 0.0005 M (1:2 systems); $I = 0.1 \text{ M}$ (KNO_3); $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$).

A comparison of the potentiometric data obtained for cloxacillin and dicloxacillin systems reveals that both ligands exhibit closely related coordination behavior toward the investigated d-block metal ions. In all studied systems, complex formation follows a similar pattern, involving the stabilization of mono- and bis-ligand species in the near-neutral pH region, followed by the progressive formation of hydroxo-ligand complexes at higher pH values. Despite this overall similarity, subtle but consistent differences are observed in the stability and distribution of the complexes. In particular, dicloxacillin tends to stabilize bis-ligand species more effectively, especially in the Cu(II) systems, where ligand-rich complexes persist over a wider pH range before hydrolysis becomes dominant. This trend may be associated with the electron-withdrawing chlorine substituents present in dicloxacillin, which influence the electronic distribution within the ligand and slightly modify its donor properties. Nevertheless, a general tendency toward higher stability of Cu(II) complexes compared to Ni(II) and Co(II) can be observed for both antibiotics. However, direct comparison within the metal series should be treated with caution due to differences in speciation and the presence of different dominant species under the studied conditions. These results indicate that substitution within the isoxazolyl ring primarily affects quantitative stability parameters rather than the fundamental coordination pattern. Although dicloxacillin tends to form slightly more stable complexes, this effect is not uniform across all systems and depends on the nature of the dominant species under given conditions. Therefore, comparison between the two ligands should be made with caution and within the full speciation context.

3.2 Equilibrium study of f-block elements

The subsequent sections focus on the systematic investigation of Nd(III), Eu(III), and Tb(III) interactions with cloxacillin, evaluated under both equimolar and ligand-excess conditions. The results enabled the determination of overall stability constants ($\log \beta$) and formation equilibrium constants ($\log K_e$), which are summarized in Table 3. Distribution diagrams in Figure 5 provide a visual representation of the pH-dependent behavior of the complexes, facilitating a clear understanding of how variations in ligand concentration influence the equilibria of the lanthanide(III)-cloxacillin system.

For the Nd(III) system (Figure 5a-b), under equimolar conditions, free Nd(III) predominates over a wide acidic and near-neutral pH range. Only a minor contribution from the protonated complex Nd(HClox) is observed at low pH (below pH 4.0). Above pH 7.0, hydrolysis becomes significant, leading to the formation of Nd(OH)₂ and Nd(OH)₃, which dominate in alkaline conditions, while contribution of mixed hydroxo-ligand species such as Nd(Clox)(OH)₃ is observed, becoming more significant in the alkaline pH region. In the presence of excess ligand, complexation is enhanced in the near-neutral pH region, with Nd(Clox)₂ becoming the predominant species. At higher pH values, mixed hydroxocomplexes Nd(Clox)₂(OH)_x (x = 1-3) are formed and remain stable prior to the eventual coexistence of Nd(OH)₂ and Nd(OH)₃ under strongly alkaline conditions.

The Eu(III) system (Figure 5c-d) exhibits stronger complexation compared to Nd(III). Under equimolar conditions, Eu(Clox) predominates over a broad pH range (approximately pH 4.0-7.0), while Eu(HClox) is significant only at low pH (below pH 2.5). Upon increasing pH, ligand-bound species are gradually replaced by hydrolyzed forms, with Eu(OH)₂ and Eu(OH)₃ becoming dominant; however, small fractions of mixed species such as Eu(Clox)(OH)₃ persist in the transition region. Under ligand-excess conditions, free Eu(III) dominates at low pH, followed by the gradual appearance of species such as Eu(HClox)(Clox) and Eu(Clox)₂ with

increasing pH. The $\text{Eu}(\text{Clox})_2$ species reaches a maximum contribution of approximately 35–40% of the total europium content. Above pH 7.0, hydrolysis becomes pronounced, initially yielding $\text{Eu}(\text{OH})_2$ and $\text{Eu}(\text{OH})_3$. Among these, $\text{Eu}(\text{Clox})(\text{OH})_3$ becomes the dominant species above pH 9.0, before being progressively replaced by fully hydrolyzed forms in strongly alkaline solutions.

For the Tb(III) system (Figure 5e–f), the overall behavior is similar to that observed for Nd(III) and Eu(III), but with slightly enhanced stability of the ligand complexes. In the equimolar system, free Tb(III) predominates between pH 2.5 and 7.0, with minor contributions from $\text{Tb}(\text{HClox})$ at low pH. Above pH 8.0, hydrolysis becomes dominant, leading to the formation of $\text{Tb}(\text{Clox})(\text{OH})_3$ with the coexistence of $\text{Tb}(\text{OH})_2$. Under ligand-excess conditions, free Tb(III) remains predominant up to approximately pH 7.0, while $\text{Tb}(\text{HClox})(\text{Clox})$ appears at lower pH values. In the near-neutral region, $\text{Tb}(\text{Clox})_2$ becomes significant, binding approximately 48% of the terbium ions. At higher pH, hydrolysis leads to the formation of $\text{Tb}(\text{OH})_2$ and $\text{Tb}(\text{Clox})_2(\text{OH})_3$, with the latter dominating up to the highest pH values studied and accounting for over 90% of the total terbium content.

Table 3. The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with cloxacillin and f-block elements (standard deviations are given in parentheses).

	Species	Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
1:1	M(HClox)	5.52(2)	3.22	5.98(4)	3.69	5.45(2)	3.15
	M(Clox)	-	-	3.71(2)	3.71	-	-
	-	-	-	-	-	-	-
	M(Clox)(OH) ₃	21.58(1)	19.73	20.89(4)	20.42	19.79(1)	21.51
1:2	M(Clox)(HClox)	-	-	8.81(4)	6.52	8.70(10)	6.40
	M(Clox) ₂	6.40(5)	6.40	5.63(4)	5.63	5.97(9)	5.97
	-	-	-	-	-	-	-
	M(Clox) ₂ (OH)	1.73(12)	5.64	-	-	-	-
	M(Clox) ₂ (OH) ₂	-9.55(8)	5.95	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-
	M(Clox) ₂ (OH) ₃	17.28(4)	6.03	17.54(3)	18.14	16.37(6)	18.97

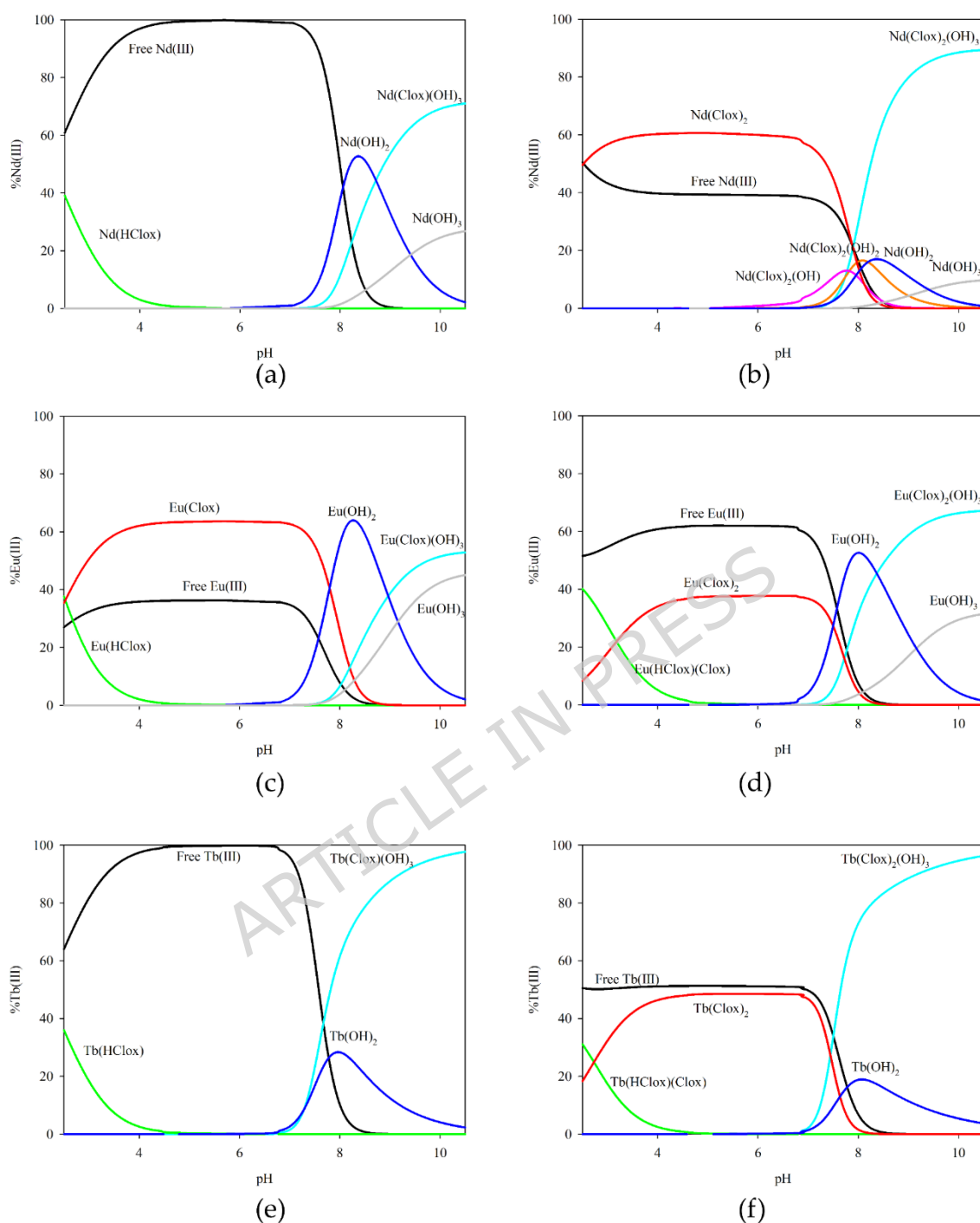


Figure 5. Distribution diagrams for the systems studied: (a) Nd(III)/Cloxacillin (1:1 ratio); (b) Nd(III)/Cloxacillin (1:2 ratio); (c) Eu(III)/Cloxacillin (1:1 ratio); (d) Eu(III)/Cloxacillin (1:2 ratio); (e) Tb(III)/Cloxacillin (1:1 ratio); (f) Tb(III)/Cloxacillin (1:2 ratio) (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.001 \text{ M}$; $C_{\text{Metal}} = 0.001 \text{ M}$ (1:1 systems) and 0.0005 M (1:2 systems); $I = 0.1 \text{ M}$ (KNO_3); $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$).

To complement the results obtained for cloxacillin, the complexation behavior of Nd(III), Eu(III), and Tb(III) ions was also investigated in the presence of dicloxacillin. The experiments were performed under the same conditions as for the cloxacillin systems, allowing the effect of ligand substitution on the stability and speciation of lanthanide(III) complexes to be evaluated. Overall stability constants ($\log\beta$) and formation equilibrium constants ($\log K_e$) were determined and are collected in Table 4, while the pH-dependent distribution of species is illustrated in Figure 6.

For the Nd(III) system (Figure 6a-b), under equimolar conditions, free Nd(III) predominates over a wide acidic pH range, while Nd(Diclox) becomes the major species in the intermediate pH range, reaching approximately 50% contribution. With increasing pH, mixed hydroxo-ligand species such as Nd(Diclox)(OH) and Nd(Diclox)(OH)₂ appear, followed by the gradual dominance of hydrolyzed forms Nd(OH)₂ and Nd(OH)₃ in alkaline conditions. In the presence of excess ligand, complexation is markedly enhanced. Nd(Diclox)₂ becomes the dominant species over a broad near-neutral pH range, while free Nd(III) is significantly suppressed. At higher pH values, Nd(Diclox)₂(OH)₂ forms and remains predominant until the onset of extensive hydrolysis, leading to the coexistence of Nd(OH)₂ and Nd(OH)₃ under strongly alkaline conditions.

The Eu(III) system (Figure 6c-d) displays stronger complexation compared to Nd(III). Under equimolar conditions, Eu(Diclox)₂ is formed over a wide pH range (approximately pH 4.0–7.0), while free Eu(III) remains present mainly at lower pH values. Protonated species such as Eu(HDiclox) and mixed complexes Eu(HDiclox)(Diclox) are relevant only in the acidic region. Above pH 7.0, ligand-bound species are progressively replaced by hydroxo complexes, with Eu(Diclox)(OH)₂ appearing first, followed by the dominance of Eu(OH)₂ and Eu(OH)₃ at higher pH. Under ligand-excess conditions, Eu(Diclox)₂ becomes the predominant form across the intermediate pH range, accounting for a major fraction of the total europium content. With increasing pH, Eu(Diclox)₂(OH)₂ appears and remains stable over a narrow alkaline region before being gradually replaced by fully hydrolyzed species, with Eu(OH)₃ dominating under strongly basic conditions.

For the Tb(III) system (Figure 6e-f), the overall behavior is similar to that observed for Nd(III) and Eu(III), but with a tendency toward higher stability of dicloxacillin complexes. In the equimolar system, free Tb(III) dominates at low pH, while Tb(Diclox) becomes significant in the intermediate pH range. Above pH 7.0–8.0, hydrolysis becomes pronounced, leading to the formation of mixed hydroxo-ligand species such as Tb(Diclox)(OH) and Tb(Diclox)(OH)₂, followed by the appearance of Tb(OH)₂ at higher pH values. In the presence of excess ligand, Tb(Diclox) predominates up to near-neutral pH, while hydrolysis is shifted toward higher pH values. In alkaline conditions, Tb(Diclox)₂(OH)₃ becomes the dominant species, binding over 80–90% of the terbium ions, before the eventual formation of Tb(OH)₂ under strongly basic conditions.

Table 4. The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied systems with dicloxacillin and f-block elements (standard deviations are given in parentheses).

Species	Nd(III)		Eu(III)		Tb(III)	
	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
M(HDiclox)(Diclox)	-	-	11.33(6)	7.78	-	-

	M(Diclox) ₂	-	-	7.61(5)	7.61	-	-
	M(HDiclox)	-	-	7.43(4)	3.88	-	-
	M(Diclox)	3.29(3)	3.29	-	-	2.97(4)	2.97
	M(Diclox)(OH)	-4.73(5)	9.04	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
	M(Diclox)(OH) ₂	12.64(3)	14.90	11.34(3)	16.20	12.37(5)	15.17
		)		)		)	
		-	-	-	-	-	-
	M(Diclox)(OH) ₃	-	-	-	-	21.50(4)	19.81
		-	-	-	-	)	-
		-	-	-	-	-	-
	M(Diclox) ₂ (OH) ₃	-	-	-	-	17.07(3)	24.24
		-	-	-	-	)	-
1:2	M(HDiclox) ₂	-	-	13.58(9)	6.48	-	-
		-	-	)	-	-	-
	M(HDiclox)(Diclox)	11.07(6)	7.52	11.33(6)	7.78	-	-
	)	)		)		-	-
	M(Diclox) ₂	7.30(4)	7.30	7.61(5)	7.61	-	-
	M(Diclox)	-	-	-	-	2.97(4)	2.97
		-	-	-	-	-	-
	M(Diclox)(OH) ₂	-	-	-	-	12.37(5)	15.17
		-	-	-	-	)	-
	M(Diclox) ₂ (OH) ₂	-8.84(5)	18.70	-8.08(6)	19.46	-	-
		-	-	-	-	-	-
	M(Diclox) ₂ (OH) ₃	-	-	-	-	17.07(3)	24.24
		-	-	-	-	)	-

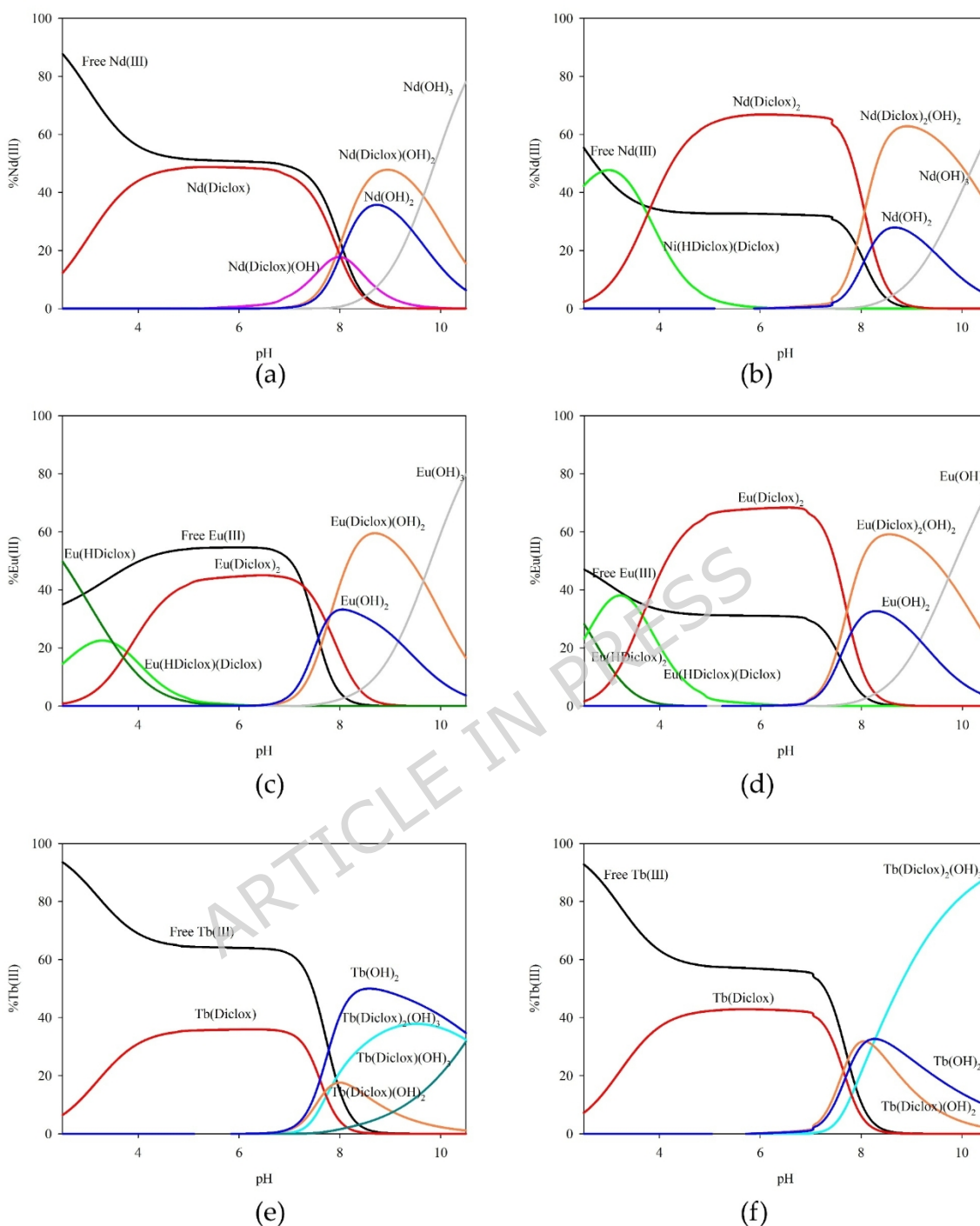


Figure 6. Distribution diagrams for the systems studied: (a) Nd(III)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (b) Nd(III)/Dicloxacillin (1:2 ratio); (c) Eu(III)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (d) Eu(III)/Dicloxacillin (1:2 ratio); (e) Tb(III)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (f) Tb(III)/Dicloxacillin (1:2 ratio) (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.001 \text{ M}$; $C_{\text{Metal}} = 0.001 \text{ M}$ (1:1 systems) and 0.0005 M (1:2 systems); $I = 0.1 \text{ M}$ (KNO_3); $T = 20^\circ \text{C}$).

Analysis of the lanthanide(III) systems obtained for cloxacillin and dicloxacillin also reveals closely related complexation behavior for both ligands. In the presence of Nd(III), Eu(III), and Tb(III), protonated complexes are observed at low pH, followed by the formation of mono- and bis-ligand species in the intermediate pH region, particularly under ligand-excess conditions. As the pH increases further, hydrolysis becomes increasingly significant, leading to the predominance of hydroxo complexes typical of lanthanide ions in aqueous solution [29,38]. Although the overall speciation pattern remains similar for both antibiotics, dicloxacillin complexes generally exhibit slightly higher stability and a broader predominance range of ligand-bound species compared with those formed by cloxacillin. This effect is especially noticeable for Eu(III) and Tb(III), where dicloxacillin stabilizes coordinated forms over a wider pH interval prior to extensive hydrolysis. The observed differences may be attributed to subtle electronic effects introduced by the chlorine substituents in dicloxacillin, which influence the donor properties of the ligand while maintaining the predominantly oxygen-donor coordination mode characteristic of lanthanide complexes. Although dicloxacillin generally shows a tendency to form more stable complexes with lanthanide(III) ions, this effect is not uniform across all systems and depends on the dominant species present under given conditions. Therefore, comparison between the two ligands should be interpreted with caution and within the context of the overall speciation behavior.

3.3. UV-Vis spectroscopy

The UV-Vis absorption spectra of Co(II), Ni(II), and Cu(II) recorded in the presence of cloxacillin (Figure 7) and dicloxacillin (Figure 8), at metal-to-ligand ratios of 1:1 and 1:2, exhibit clear coordination-induced modifications relative to both the free ligands and hydrated metal ions. In all systems, complex formation is manifested by changes in band intensity, broadening, and subtle reshaping of absorption envelopes across the 400–900 nm region, reflecting perturbation of the metal coordination environment upon ligand binding. The UV region was not analyzed in detail due to the dominance of intense ligand-centered transitions and significant band overlap.

It should be noted that cloxacillin and dicloxacillin absorb predominantly in the UV region due to ligand-centered $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ transitions; therefore, their contribution to the visible range is minimal. Consequently, the spectra recorded above 400 nm primarily reflect changes in the coordination environment of the metal ions. Consequently, the spectra show above 400 nm mainly reflect changes in the coordination environment of the metal ions rather than intrinsic ligand absorption. Despite the low intensity of the bands ($Abs < 0.002$), systematic and reproducible changes in band shape and intensity are observed as a function of pH and ligand-to-metal ratio. These changes correspond to the formation and transformation of mono-, bis-, and hydroxo-ligand species identified in the potentiometric analysis.

For Co(II) and Ni(II), the spectral changes are expressed mainly as gradual intensity variations and modification of broad visible bands rather than the appearance of new well-defined maxima. The evolution of the spectra with increasing pH corresponds to progressive ligand deprotonation and stabilization of mono- and bis-ligand complexes, in agreement with potentiometric speciation models. In both metal systems, ligand-excess conditions enhance these effects, confirming the predominance of coordinated species over hydrated ions. Notably, the dicloxacillin systems display more pronounced hyperchromic responses and

smoother band profiles, indicating stronger metal-ligand interaction and greater stabilization of ligand-bound forms compared to cloxacillin.

In contrast, Cu(II) exhibits substantially stronger spectral responses for both ligands. Coordination leads to significant enhancement and broadening of absorption bands in the 550–800 nm region, consistent with marked modification of the copper(II) coordination sphere. These effects intensify under ligand-excess and alkaline conditions, reflecting replacement of coordinated water molecules by N,O-donor sites and increasing involvement of deprotonated carboxylate groups. The magnitude of the hyperchromic enhancement is particularly pronounced in the dicloxacillin systems, supporting the greater stability of Cu-dicloxacillin complexes and the formation of mixed hydroxo-ligand species at higher pH.

Overall, the spectroscopic results are fully consistent with the potentiometric speciation models and confirms that both ligands promote similar coordination modes, yet dicloxacillin induces stronger spectral responses, indicative of enhanced metal-ligand interaction. The effect is most evident for Cu(II), highlighting the sensitivity of this ion to subtle modifications in ligand structure. Although the absorption bands in the visible region are of low intensity, their systematic evolution with pH and ligand-to-metal ratio provides meaningful qualitative insight into coordination processes and remains consistent with potentiometric speciation models.

ARTICLE IN PRESS

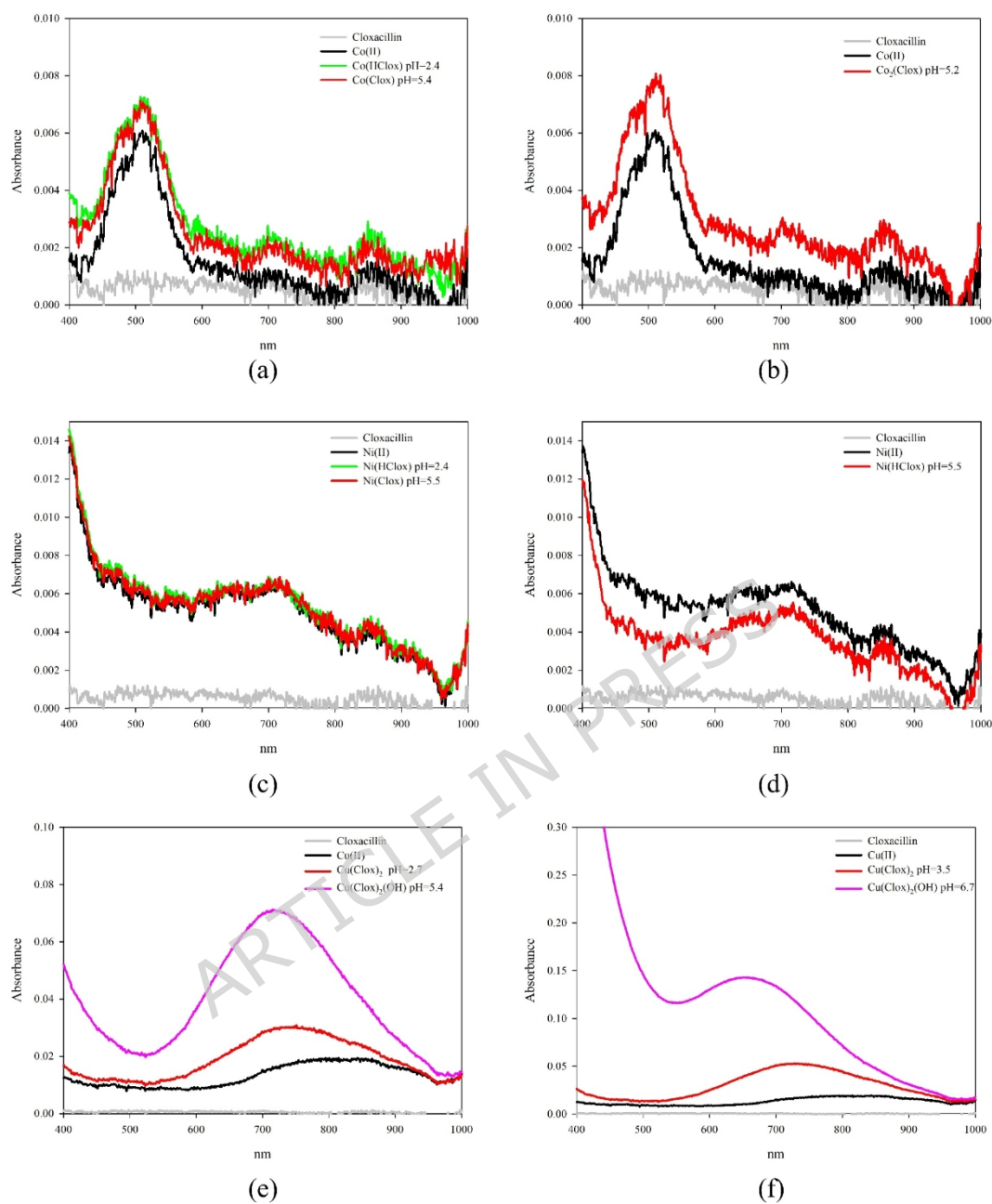


Figure 7. UV-Vis absorption spectra of the systems: (a) Co(II)/Cloxacillin (1:1 ratio); (b) Co(II)/Cloxacillin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/Cloxacillin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/Cloxacillin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/Cloxacillin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/Cloxacillin (1:2 ratio) (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.001 \text{ M}$; $C_{\text{Metal}} = 0.001 \text{ M}$ (1:1 systems) and 0.0005 M (1:2 systems)).

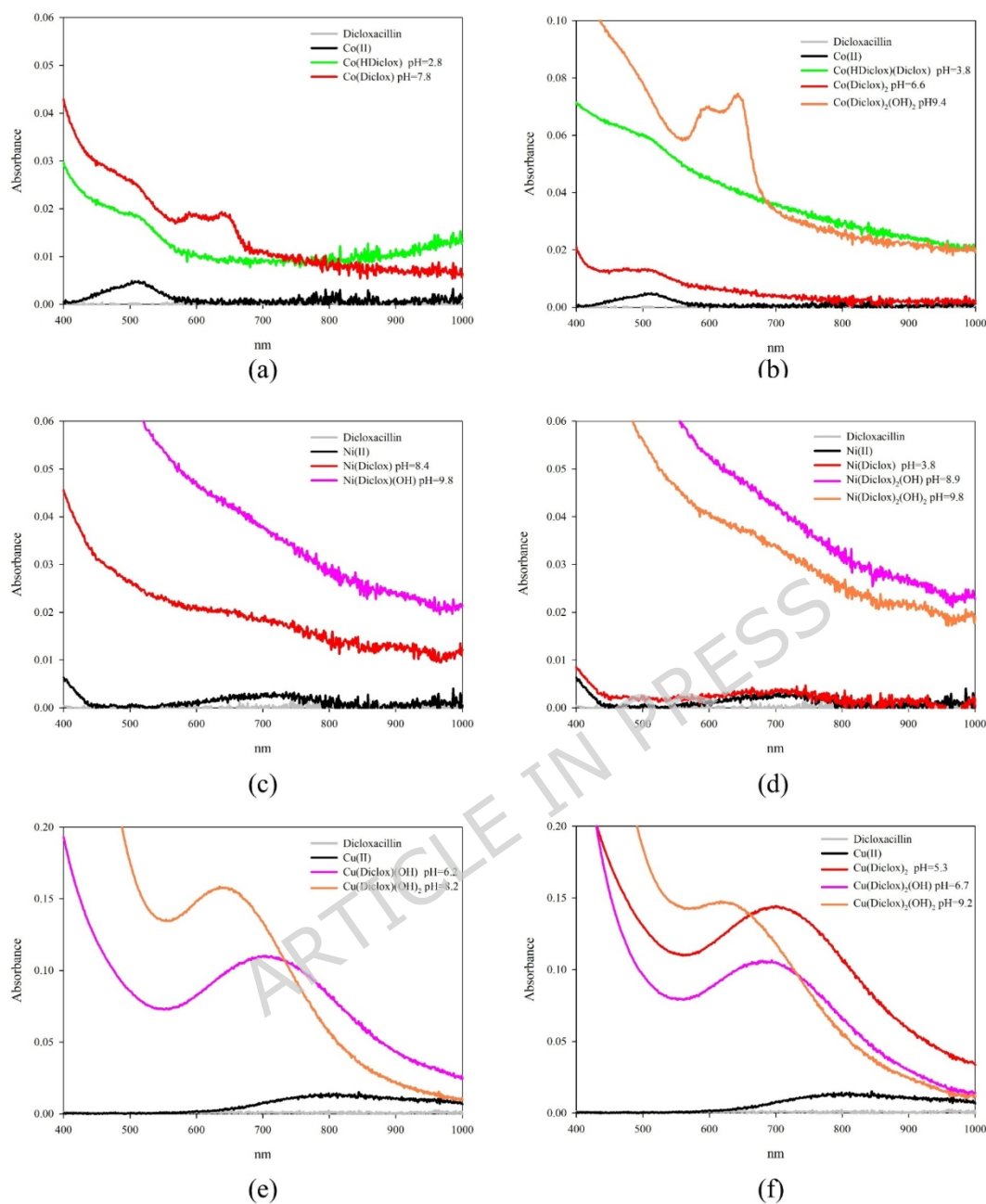


Figure 8. UV-Vis absorption spectra of the systems: (a) Co(II)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (b) Co(II)/Dicloxacillin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/Dicloxacillin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/Dicloxacillin (1:2 ratio) (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.001 \text{ M}$; $C_{\text{Metal}} = 0.001 \text{ M}$ (1:1 systems) and 0.0005 M (1:2 systems)).

3.4. Luminescence spectroscopy

Emission spectra were recorded for Eu(III) and Tb(III) systems containing cloxacillin and dicloxacillin at pH values corresponding to the predominant species identified in potentiometric studies (Figure 9 and 10). The spectra display the characteristic narrow f-f

transitions of lanthanide(III) ions, whose intensities and relative band ratios depend strongly on ligand type and solution pH, reflecting changes in the coordination environment upon complex formation and ligand deprotonation.

For the Eu(III) systems with cloxacillin, characteristic emissions from the 5D_0 excited state to the 7F_J ($J = 1-4$) levels is clearly observed, with the hypersensitive $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ transition dominating the spectra. The intensity of this band increases noticeably for ligand-bound species relative to free Eu(III), indicating effective ligand-to-metal energy transfer and modification of the europium coordination sphere. At higher pH values, the formation of insoluble europium hydroxide or strongly hydrolyzed forms leads to a reduction in observable emission intensity.

In the dicloxacillin systems, the overall emission intensity is substantially higher than for cloxacillin under comparable conditions. The $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ transition is significantly enhanced, particularly for bis-ligand and hydroxo-ligand species, suggesting more efficient sensitization of Eu(III). Variations in the relative intensities of the $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ and $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ bands further indicate changes in local symmetry around the Eu(III) ion upon ligand substitution.

For Tb(III) complexes with cloxacillin, characteristic emissions from the 5D_4 level to the 7F_J ($J = 3-6$) states are observed, with the $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ transition being the most intense. Complex formation results in enhancement of this band compared to free Tb(III), particularly at near-neutral pH where ligand-bound species predominate. At higher pH values, partial quenching occurs, likely associated with hydroxo-species formation and increased non-radiative vibrational deactivation.

In contrast, the Tb(III)-dicloxacillin systems exhibit substantially stronger emission intensities, especially for hydroxo-ligand species. The $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ transition shows pronounced enhancement relative to both free Tb(III) and the corresponding cloxacillin complexes. This amplification suggests more efficient antenna sensitization and improved shielding of the Tb(III) ion from coordinated water molecules, resulting in reduced non-radiative decay.

Overall, the luminescence results corroborate the potentiometric findings and demonstrate that ligand substitution significantly influences the stabilization and local symmetry of Ln(III) complexes, with dicloxacillin appears to provide more efficient sensitization under the applied experimental conditions and stronger emission enhancement than cloxacillin.

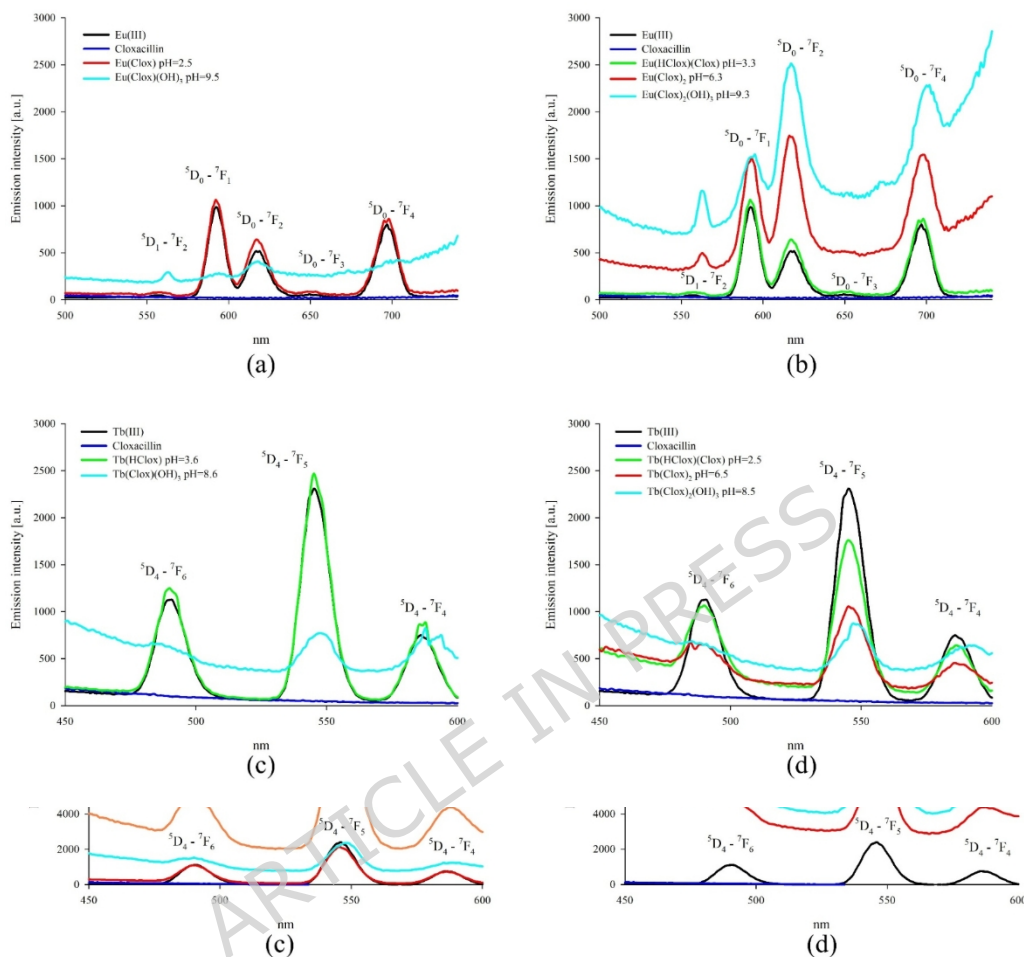


Figure 9. Emission spectra of the systems: (a) Eu(III)/Cloxacillin (1:1 ratio); (b) Eu(III)/Cloxacillin (1:2 ratio); (c) Tb(III)/Cloxacillin (1:1 ratio); (d) Tb(III)/Cloxacillin (1:2 ratio) (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.001 \text{ M}$; $C_{\text{Metal}} = 0.001 \text{ M}$ (1:1 systems) and 0.0005 M (1:2 systems)).

Figure 10. Emission spectra of the systems: (a) Eu(III)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (b) Eu(III)/Dicloxacillin (1:2 ratio); (c) Tb(III)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (d) Tb(III)/Dicloxacillin (1:2 ratio) (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.001 \text{ M}$; $C_{\text{Metal}} = 0.001 \text{ M}$ (1:1 systems) and 0.0005 M (1:2 systems)).

3.5. IR spectroscopy

The infrared spectra of cloxacillin- and dicloxacillin-metal complexes (Figure 11) confirm the presence of characteristic functional groups and provide insight into structural modifications occurring upon coordination. All spectra were recorded under identical conditions to enable direct comparison between free ligands, hydrated metal ions, and the corresponding complex

species. Coordination-induced changes are reflected mainly in band shifts, intensity variations, and subtle modifications of band profiles, indicating involvement of specific donor groups in metal binding. Although multiple spectra are presented in a single plot, the key coordination-related changes can be clearly identified in the characteristic vibrational regions relevant to metal binding.

In all systems, the most significant spectral changes are observed in the regions associated with the carboxylate, amide, and β -lactam carbonyl groups. The asymmetric and symmetric stretching vibrations of the carboxylate group ($\nu_{as}(\text{COO}^-)$ and $\nu_s(\text{COO}^-)$), typically appearing in the 1550–1400 cm^{-1} range, exhibit noticeable shifts and intensity variations upon complex formation. These variations indicate deprotonation of the carboxyl group and its direct participation in coordination. The separation between ν_{as} and ν_s bands ($\Delta\nu = \nu_{as} - \nu_s$) falls within the range of approximately 150–200 cm^{-1} , which is typical for coordinated carboxylate groups; however, the exact binding mode cannot be unambiguously determined based on IR data alone.

Alterations are also observed in the carbonyl stretching regions. The amide C=O band (around 1650–1690 cm^{-1}) and the β -lactam carbonyl band (approximately 1750–1770 cm^{-1}) display slight shifts or changes in intensity. The β -lactam carbonyl band remains at approximately 1760 cm^{-1} in both free and complexed forms, indicating that this group is not directly involved in coordination. Nevertheless, the persistence of these bands without significant splitting or disappearance confirms preservation of the β -lactam ring structure.

Additional variations are observed in the 1200–1000 cm^{-1} region, corresponding to C–O and C–N stretching vibrations, further supporting ligand participation in metal binding. In several complexes, broadening of bands in the 3200–3500 cm^{-1} region suggests modification of hydrogen-bonding interactions and possible changes in the hydration sphere upon coordination.

Comparison of cloxacillin and dicloxacillin systems reveals qualitatively similar spectral patterns; however, the dicloxacillin complexes generally display more pronounced band shifts and intensity changes in the carboxylate region, consistent with stronger metal-ligand interactions inferred from potentiometric and spectroscopic data. For lanthanide(III) complexes, the spectral changes are generally less pronounced in terms of band shifts but show clear intensity redistribution in the carboxylate and carbonyl regions, consistent with predominantly oxygen-donor coordination. In contrast, the d-block metal complexes display slightly more distinct band modifications, suggesting stronger perturbation of the ligand electronic structure.

Overall, the IR results support coordination involving the deprotonated carboxylate group as the primary binding site, with additional contributions from amide and neighboring donor functionalities [32,36,39,40]. The observed spectral modifications are consistent with the formation of mono-, bis-, and hydroxo-ligand complexes identified in solution studies.

The IR spectra recorded for both equimolar systems and systems containing a two-fold excess of ligand are provided in the Supplementary Materials (Figures S1–S4).

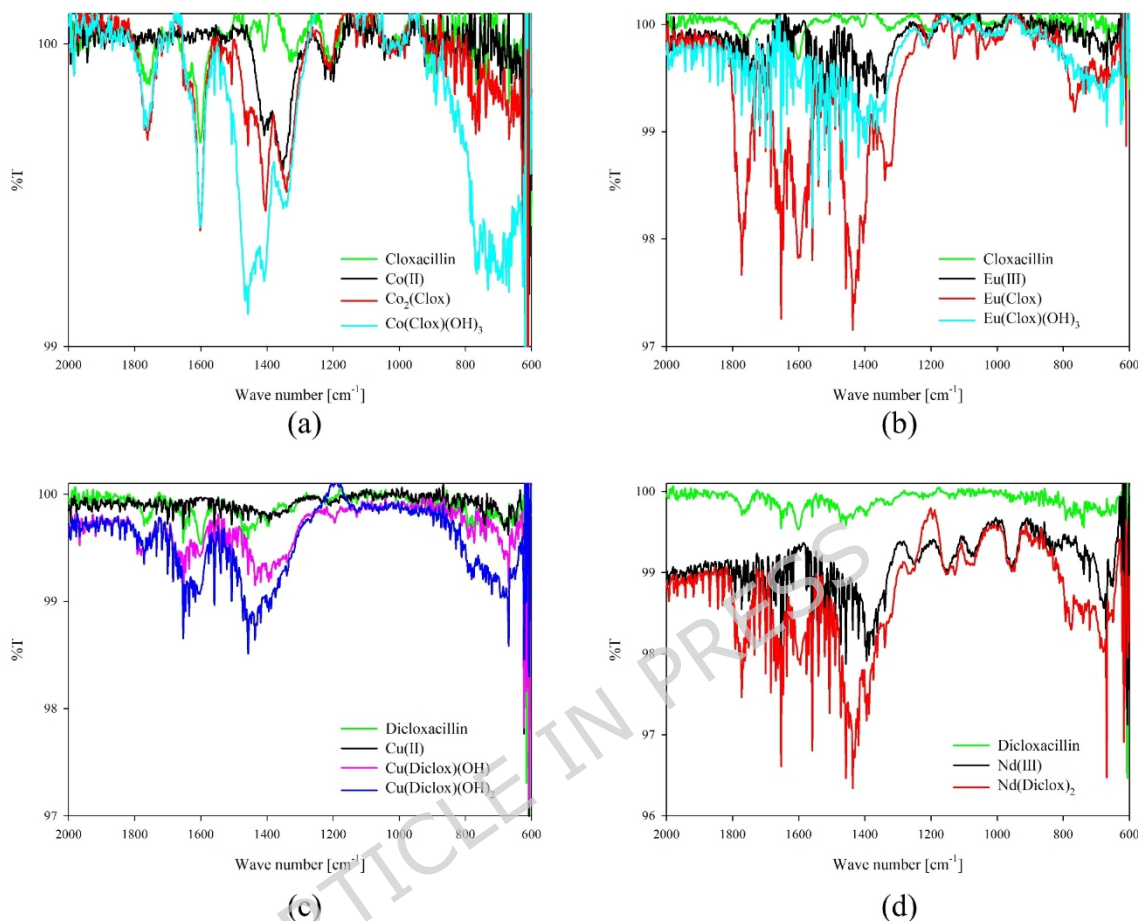


Figure 11. IR spectra of the systems: (a) Co(II)/Cloxacillin (1:2 ratio); (b) Eu(III)/Cloxacillin (1:1 ratio); (c) Cu(II)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (d) Nd(III)/Dicloxacillin (1:2 ratio) (Experimental conditions: $C_{\text{Ligand}} = 0.01 \text{ M}$; $C_{\text{Metal}} = 0.01 \text{ M}$ (1:1 systems) and 0.005 M (1:2 systems)).

4. Conclusions

The present study provides a comprehensive characterization of binary complexes formed between cloxacillin and dicloxacillin and selected d-block (Co(II), Ni(II), Cu(II)) and lanthanide(III) (Nd(III), Eu(III), Tb(III)) ions. Potentiometric investigations confirmed the formation of well-defined mono- and bis-ligand complexes under equimolar and ligand-excess conditions, respectively, with hydroxo-ligand species appearing at higher pH values. In all systems, speciation is strongly pH-dependent, progressing from protonated forms at low pH to simple complexes and, ultimately, to mixed hydroxo species under alkaline conditions.

Analysis of the potentiometric titration data enabled the determination of reliable overall stability constants ($\log\beta$) and stepwise formation constants for all identified species. The obtained equilibrium parameters reveal systematic differences in metal-ligand affinity

across the studied series, clearly distinguishing the behavior of d-block and lanthanide(III) ions. In particular, Cu(II) exhibits the highest binding tendency among the transition metals, forming the most diversified set of coordinated species, while Co(II) and Ni(II) display more moderate stability under comparable conditions. In the lanthanide(III) systems, complex stability reflects the expected trend associated with increasing Lewis acidity along the Nd(III) → Eu(III) → Tb(III) sequence. Importantly, replacing cloxacillin with dicloxacillin results in discernible changes in both stability constants and species distribution, demonstrating that even minor structural modification of the ligand framework has a significant impact on the equilibrium behavior of the system.

The spectroscopic results fully corroborate the potentiometric models. UV-Vis spectra of the d-block systems reveal coordination-induced perturbations of the ligand field, particularly pronounced for Cu(II), while FT-IR data confirm the involvement of the deprotonated carboxylate group as the primary coordination site, with possible additional contributions from amide and neighboring donor functionalities. The persistence of the β -lactam carbonyl band indicates preservation of the antibiotic core structure upon complexation. Luminescence studies of Eu(III) and Tb(III) systems demonstrate effective ligand-to-metal energy transfer, with dicloxacillin providing more efficient sensitization and stronger emission enhancement, reflecting improved shielding of the lanthanide ion from coordinated water molecules.

Overall, the results demonstrate that minor structural differences between cloxacillin and dicloxacillin significantly influence complex stability, speciation, and spectroscopic behavior. The combined potentiometric and spectroscopic approach provides a coherent description of coordination modes and pH-dependent equilibria, contributing to a deeper understanding of β -lactam-metal interactions. These findings may serve as a foundation for future studies exploring the physicochemical consequences of metal complexation of isoxazolympenicillins, as well as their potential impact on biological activity.

5. Acknowledgements

The author, Justyna Frymark, gratefully acknowledges the support of the Adam Mickiewicz University Foundation through a scholarship for the 2025/2026 academic year.

6. References

- [1] Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K. M.; Wertheim, H. F. L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H.; Greko, C.; So, A. D.; Bigdeli, M.; Tomson, G.; Woodhouse, W.; Ombaka, E.; Peralta, A. Q.; Qamar, F. N.; Mir, F.; Kariuki, S.; Bhutta, Z. A.; Coates, A.; Bergstrom, R.; Wright, G. D.; Brown, E. D.; Cars, O. Antibiotic Resistance—the Need for Global Solutions. *The Lancet Infectious Diseases* **2013**, *13* (12), 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).
- [2] Narendrakumar, L.; Chakraborty, M.; Kumari, S.; Paul, D.; Das, B. β -Lactam Potentiators to Re-Sensitize Resistant Pathogens: Discovery, Development, Clinical Use and the Way Forward. *Front. Microbiol.* **2023**, *13*, 1092556. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1092556>.
- [3] De Rosa, M.; Verdino, A.; Soriente, A.; Marabotti, A. The Odd Couple(s): An Overview of Beta-Lactam Antibiotics Bearing More Than One Pharmacophoric Group. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (2), 617. <https://doi.org/10.3390/ijms22020617>.

- [4] Salam, Md. A.; Al-Amin, Md. Y.; Salam, M. T.; Pawar, J. S.; Akhter, N.; Rabaan, A. A.; Alqumber, M. A. A. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare* **2023**, *11* (13), 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>.
- [5] Michael Marcy, S.; Klein, J. O. The Isoxazolyl Penicillins: Oxacillin, Cloxacillin, and Dicloxacillin. *Med Clin North Am* **1970**, *54* (5), 1127–1143. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)32582-2](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)32582-2).
- [6] Hou, J. P.; Poole, J. W. β -Lactam Antibiotics: Their Physicochemical Properties and Biological Activities in Relation to Structure. *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60* (4), 503–532. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600402>.
- [7] Jarlev, J. O.; Rosdahl, V. T.; Mortensen, I.; Bentzon, M. W. In-Vitro Activity and β -Lactamase Stability of Methicillin, Isoxazolyl Penicillins and Cephalothin against Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **1988**, *22* (2), 119–125. <https://doi.org/10.1093/jac/22.2.119>.
- [8] Watkins, R. R.; Bonomo, R. A. β -Lactam Antibiotics. In *Infectious Diseases*; Elsevier, 2017; pp 1203–1216.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00140-4>.
- [9] Wu, G.; Zheng, Y.; Zhou, H.; Hu, X.; Liu, J.; Zhai, Y.; Zhu, M.; Wu, L.; Shentu, J. Safety and Pharmacokinetics of Dicloxacillin in Healthy Chinese Volunteers Following Single and Multiple Oral Doses. *DDDT* **2015**, 5687. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S92117>.
- [10] Sandberg, A.; Jensen, K. S.; Baudoux, P.; Van Bambeke, F.; Tulkens, P. M.; Frimodt-Møller, N. Intra- and Extracellular Activities of Dicloxacillin against *Staphylococcus Aureus* *In Vivo* and *In Vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (6), 2391–2400. <https://doi.org/10.1128/AAC.01400-09>.
- [11] Bru, J. P.; Garraffo, R. Role of Intravenous Cloxacillin for Inpatient Infections. *Médecine et Maladies Infectieuses* **2012**, *42* (6), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2011.10.015>.
- [12] Neuville, M.; El-Helali, N.; Magalhaes, E.; Radjou, A.; Smonig, R.; Soubirou, J.-F.; Voiriot, G.; Le Monnier, A.; Ruckly, S.; Bouadma, L.; Sonnevile, R.; Timsit, J.-F.; Mourvillier, B. Systematic Overdosing of Oxa- and Cloxacillin in Severe Infections Treated in ICU: Risk Factors and Side Effects. *Ann. Intensive Care* **2017**, *7* (1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0255-8>.
- [13] Bush, K.; Bradford, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6* (8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>.
- [14] Foster, T. J. Can β -Lactam Antibiotics Be Resurrected to Combat MRSA? *Trends Microbiol.* **2019**, *27* (1), 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.005>.
- [15] Abebe, A.; Birhanu, A. Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus: Molecular Mechanisms Underlying Drug Resistance Development and Novel Strategies to Combat. *IDR* **2023**, Volume 16, 7641–7662. <https://doi.org/10.2147/IDR.S428103>.
- [16] Waters, E. M.; Rudkin, J. K.; Coughlan, S.; Clair, G. C.; Adkins, J. N.; Gore, S.; Xia, G.; Black, N. S.; Downing, T.; O'Neill, E.; Kadioglu, A.; O'Gara, J. P. Redeploying β -Lactam Antibiotics as a Novel Antivirulence Strategy for the Treatment of Methicillin-Resistant

Staphylococcus Aureus Infections. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215* (1), 80–87.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiw461>.

[17] Turner, N. A.; Sharma-Kuinkel, B. K.; Maskarinec, S. A.; Eichenberger, E. M.; Shah, P. P.; Carugati, M.; Holland, T. L.; Fowler, V. G. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: An Overview of Basic and Clinical Research. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*(4), 203–218.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>.

[18] Wang, C.; Wei, X.; Zhong, L.; Chan, C.-L.; Li, H.; Sun, H. Metal-Based Approaches for the Fight against Antimicrobial Resistance: Mechanisms, Opportunities, and Challenges. *J. Am. Chem. Soc.* **2025**, *147*(15), 12361–12380. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c16035>.

[19] Möhler, J. S.; Kolmar, T.; Synnatschke, K.; Hergert, M.; Wilson, L. A.; Ramu, S.; Elliott, A. G.; Blaskovich, M. A. T.; Sidjabat, H. E.; Paterson, D. L.; Schenk, G.; Cooper, M. A.; Ziora, Z. M. Enhancement of Antibiotic-Activity through Complexation with Metal Ions - Combined ITC, NMR, Enzymatic and Biological Studies. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *167*, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.028>.

[20] Zabiszak, M.; Frymark, J.; Ogawa, K.; Skrobańska, M.; Nowak, M.; Jastrzab, R.; Kaczmarek, M. T. Complexes of β -Lactam Antibiotics and Their Schiff-Base Derivatives as a Weapon in the Fight against Bacterial Resistance. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *493*, 215326.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215326>.

[21] Alaoui Mdarhri, H.; Benmessaoud, R.; Yacoubi, H.; Seffar, L.; Guennouni Assimi, H.; Hamam, M.; Boussettine, R.; Filali-Ansari, N.; Lahlou, F. A.; Diawara, I.; Ennaji, M. M.; Kettani-Halabi, M. Alternatives Therapeutic Approaches to Conventional Antibiotics: Advantages, Limitations and Potential Application in Medicine. *Antibiotics* **2022**, *11* (12), 1826. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121826>.

[22] Claudel, M.; Schwarte, J. V.; Fromm, K. M. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. *Chemistry* **2020**, *2* (4), 849–899.
<https://doi.org/10.3390/chemistry2040056>.

[23] Wang, X.; Liu, S.; Li, M.; Yu, P.; Chu, X.; Li, L.; Tan, G.; Wang, Y.; Chen, X.; Zhang, Y.; Ning, C. The Synergistic Antibacterial Activity and Mechanism of Multicomponent Metal Ions-Containing Aqueous Solutions against *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2016**, *163*, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.07.019>.

[24] Evans, A.; Kavanagh, K. A. Evaluation of Metal-Based Antimicrobial Compounds for the Treatment of Bacterial Pathogens. *J. Med. Microbiol.* **2021**, *70* (5).
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001363>.

[25] Alkhalawi, M. F. H.; Mohammed, M. H.; Hemmatzadeh, F.; Petrovski, K. Exploring Metal Ions as Potential Antimicrobial Agents to Combat Future Drug Resistance in *Mycoplasma Bovis*. *Microorganisms* **2025**, *13* (1), 169.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms13010169>.

[26] Frei, A.; Verderosa, A. D.; Elliott, A. G.; Zuegg, J.; Blaskovich, M. A. T. Metals to Combat Antimicrobial Resistance. *Nat. Rev. Chem.* **2023**, *7*(3), 202–224.
<https://doi.org/10.1038/s41570-023-00463-4>.

- [27] Kumar, N.; Kaushal, R.; Awasthi, P. Transition Metal Complexes as Antibacterial Agents: An Overview. *J. Fluoresc* **2025**. <https://doi.org/10.1007/s10895-025-04313-y>.
- [28] Wang, Q.; He, X.; Xiong, H.; Chen, Y.; Huang, L. Structure, Mechanism, and Toxicity in Antibiotics Metal Complexation: Recent Advances and Perspectives. *Sci. Total Environ.* **2022**, *848*, 157778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157778>.
- [29] Misra, S. N.; Gagnani, M. A.; M., I. D.; Shukla, R. S. Biological and Clinical Aspects of Lanthanide Coordination Compounds. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2004**, *2* (3–4), 155–192. <https://doi.org/10.1155/S1565363304000111>.
- [30] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of Equilibria in Solution. Determination of Equilibrium Constants with the HYPERQUAD Suite of Programs. *Talanta* **1996**, *43* (10), 1739–1753. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(96\)01958-3](https://doi.org/10.1016/0039-9140(96)01958-3).
- [31] Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. Hyperquad Simulation and Speciation (HySS): A Utility Program for the Investigation of Equilibria Involving Soluble and Partially Soluble Species. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184* (1), 311–318. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00260-4](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00260-4).
- [32] Frymark, J.; Zabiszak, M.; Grajewski, J.; Tylkowski, B.; Jastrzab, R. Insights into Complex Compounds of Ampicillin: Potentiometric and Spectroscopic Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26* (15), 7605. <https://doi.org/10.3390/ijms26157605>.
- [33] Zabiszak, M.; Frymark, J.; Nowak, M.; Grajewski, J.; Stachowiak, K.; Kaczmarek, M. T.; Jastrzab, R. Influence of D-Electron Divalent Metal Ions in Complex Formation with L-Tartaric and L-Malic Acids. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5290. <https://doi.org/10.3390/molecules26175290>.
- [34] Frymark, J.; Zabiszak, M.; Grajewski, J.; Hnatejko, Z.; Kołodyńska, D.; Kaczmarek, M. T.; Jastrzab, R. Excess of Polyamine as a Factor Influencing the Mode of Coordination in the Eu(III)/ α -Hydroxy Acid/Spermine System. *Polyhedron* **2022**, *221*, 115853. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115853>.
- [35] Zabiszak, M.; Frymark, J.; Grajewski, J.; Jastrzab, R. Spectroscopic Studies of Lanthanide(III) Complexes with L-Malic Acid in Binary Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (17), 9210. <https://doi.org/10.3390/ijms25179210>.
- [36] Frymark, J.; Zabiszak, M.; Ogawa, K.; Jastrzab, R. Coordination Chemistry of Amoxicillin: Potentiometric and Spectroscopic Characterization of Complexes Compounds of Amoxicillin. *J. Mol. Liq.* **2026**, *444*, 129190. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.129190>.
- [37] Glasoe, P. K.; Long, F. A. USE OF GLASS ELECTRODES TO MEASURE ACIDITIES IN DEUTERIUM OXIDE^{1,2}. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64* (1), 188–190. <https://doi.org/10.1021/j100830a521>.
- [38] Byrne, R. H.; Li, B. Comparative Complexation Behavior of the Rare Earths. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1995**, *59* (22), 4575–4589. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00303-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00303-7).

[39] Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*, 1st ed.; Wiley, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470405840>.

[40] Deacon, G. Relationships between the Carbon-Oxygen Stretching Frequencies of Carboxylato Complexes and the Type of Carboxylate Coordination. *Coordination Chemistry Reviews* **1980**, *33* (3), 227–250. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80455-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80455-5).

Author contributions:

Justyna Frymark (J. F.): Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Project administration, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. Michał Zabiszak (M. Z.): Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. Małgorzata T. Kaczmarek (M. T. K.): Writing – review & editing, Formal analysis. Renata Jastrzab (R. J.): Writing – review & editing, Validation, Supervision, Re-sources, Methodology, Funding acquisition.

Data availability

Data will be made available on request. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.F.

Competing interest

The author(s) declare no competing interests.

Additional information

The online version contains supplementary material will be available.

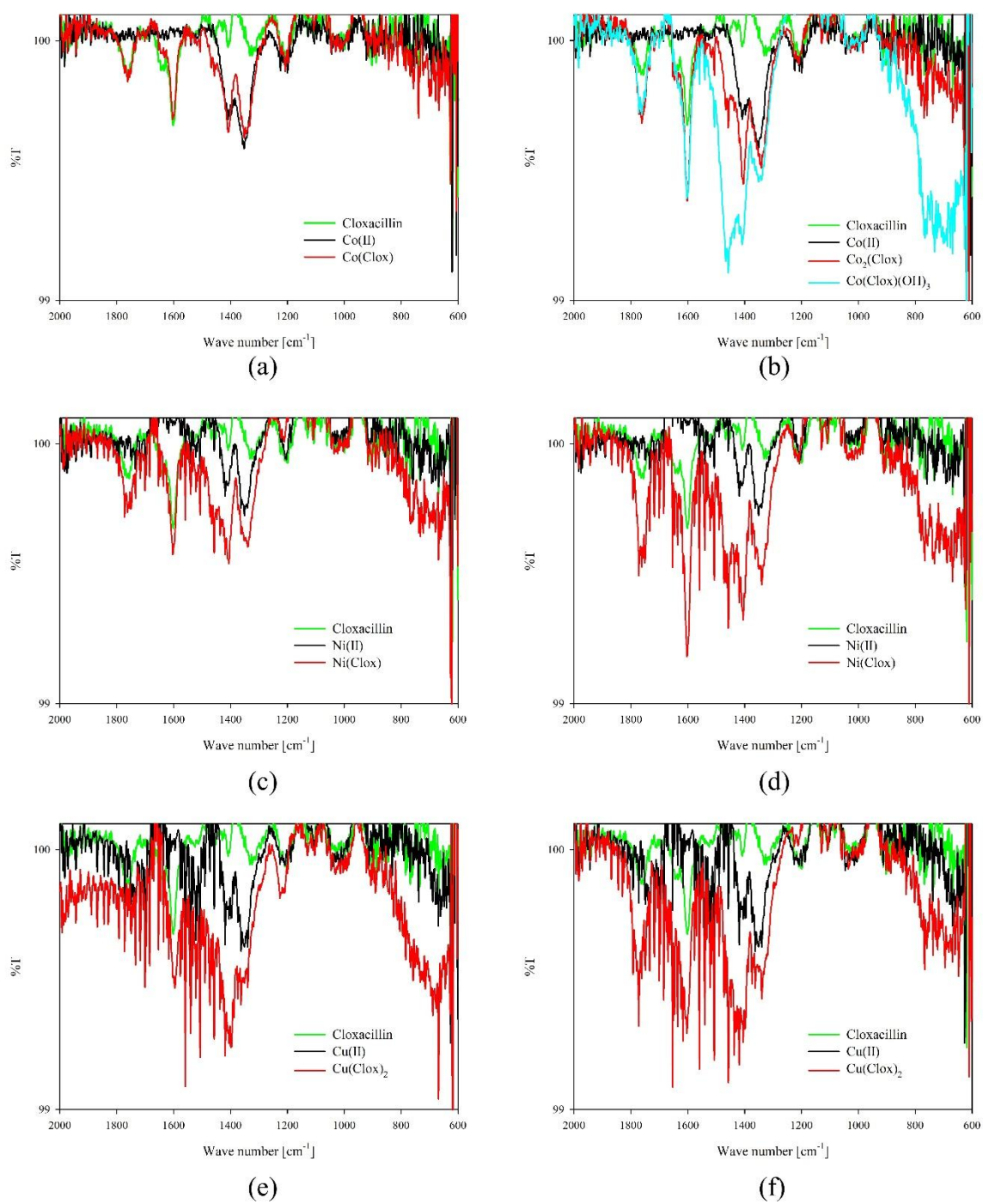


Figure S1. IR spectra of (a) Co(II)/Cloxacillin (1:1 ratio); (b) Co(II)/Cloxacillin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/Cloxacillin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/Cloxacillin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/Cloxacillin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/Cloxacillin (1:2 ratio).

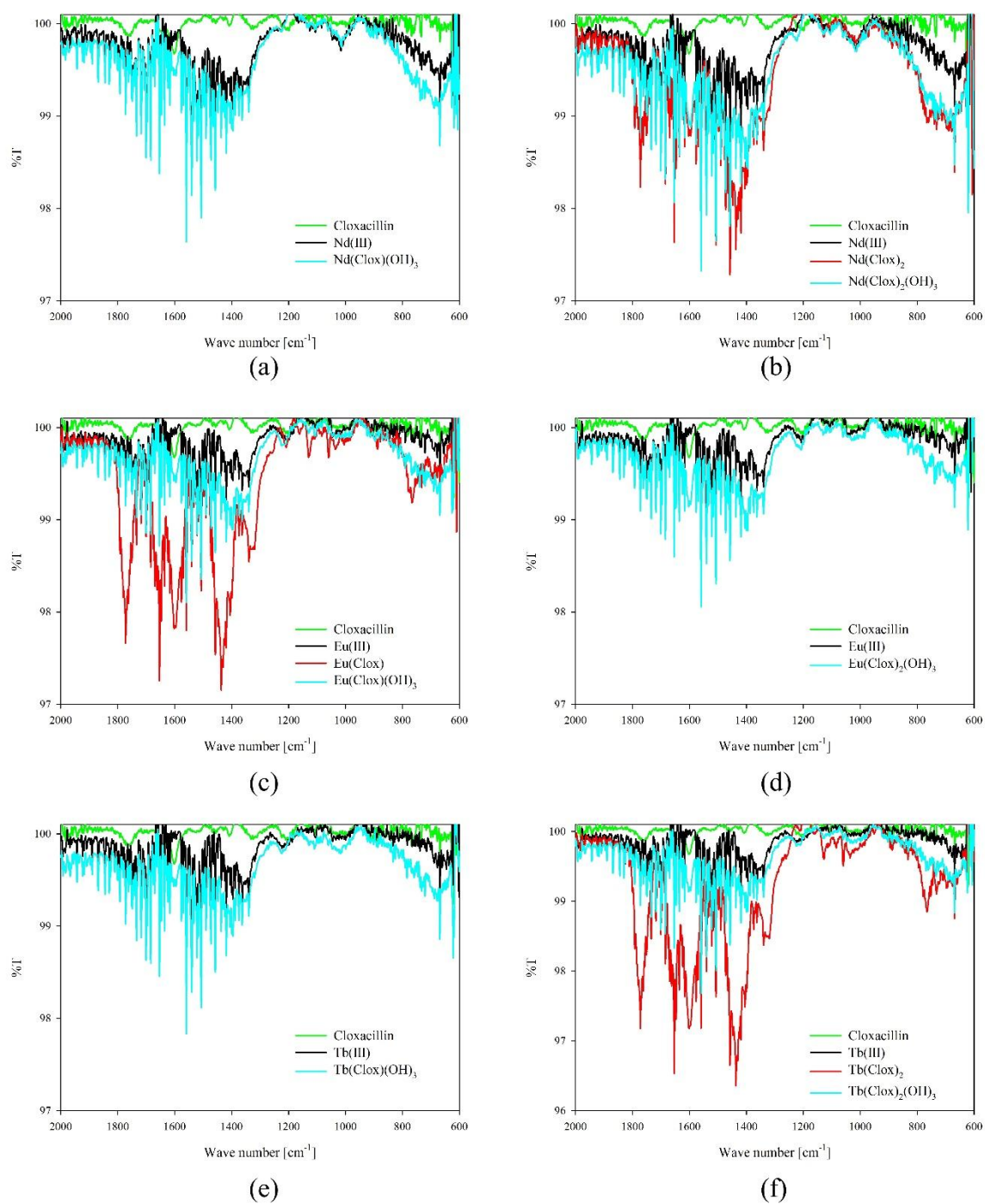


Figure S2. IR spectra of (a) Nd(III)/Cloxacillin (1:1 ratio); (b) Nd(III)/Cloxacillin (1:2 ratio); (c) Eu(III)/Cloxacillin (1:1 ratio); (d) Eu(III)/Cloxacillin (1:2 ratio); (e) Tb(III)/Cloxacillin (1:1 ratio); (f) Tb(III)/Cloxacillin (1:2 ratio).

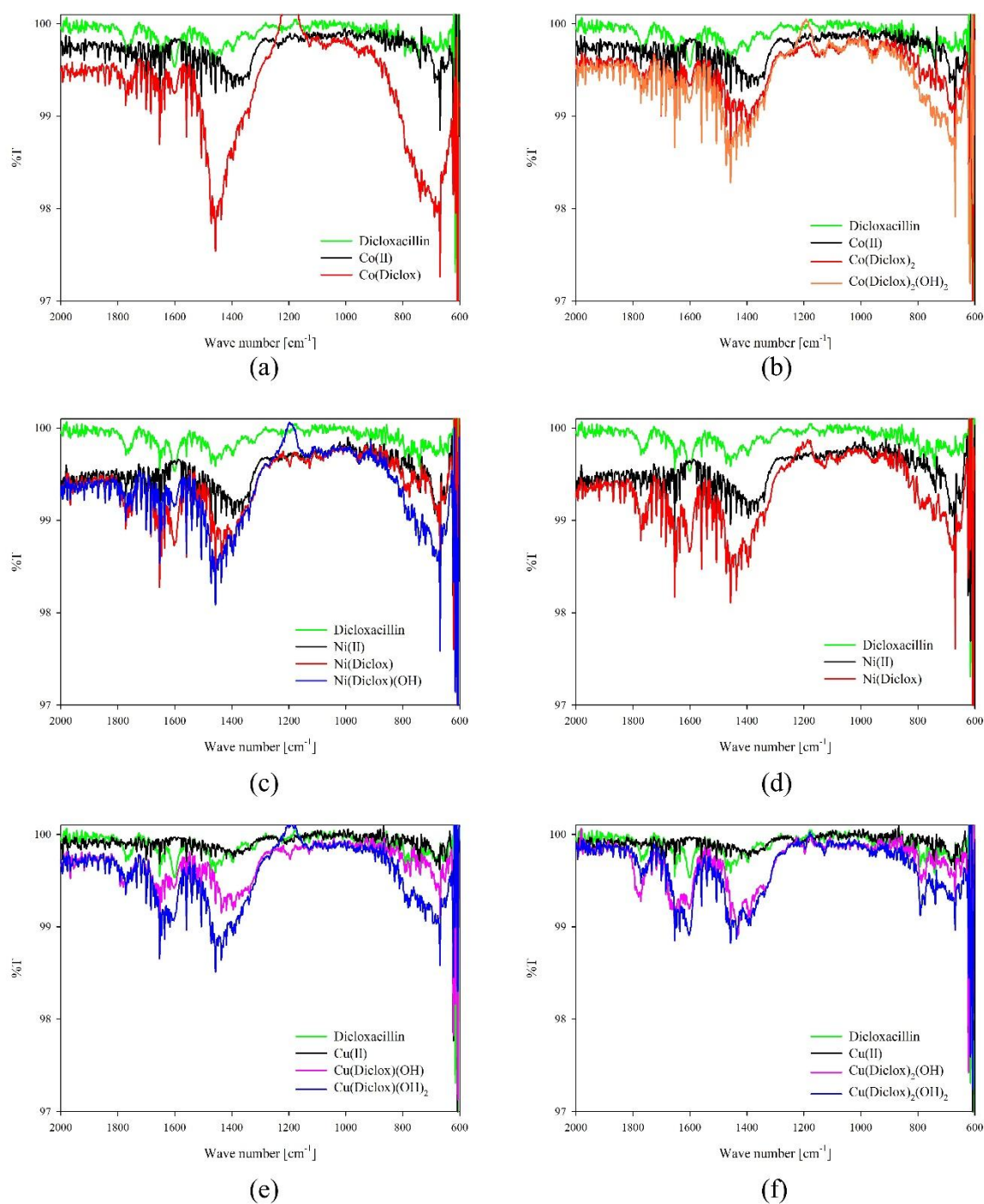


Figure S3. IR spectra of (a) Co(II)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (b) Co(II)/Dicloxacillin (1:2 ratio); (c) Ni(II)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (d) Ni(II)/Dicloxacillin (1:2 ratio); (e) Cu(II)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (f) Cu(II)/Dicloxacillin (1:2 ratio).

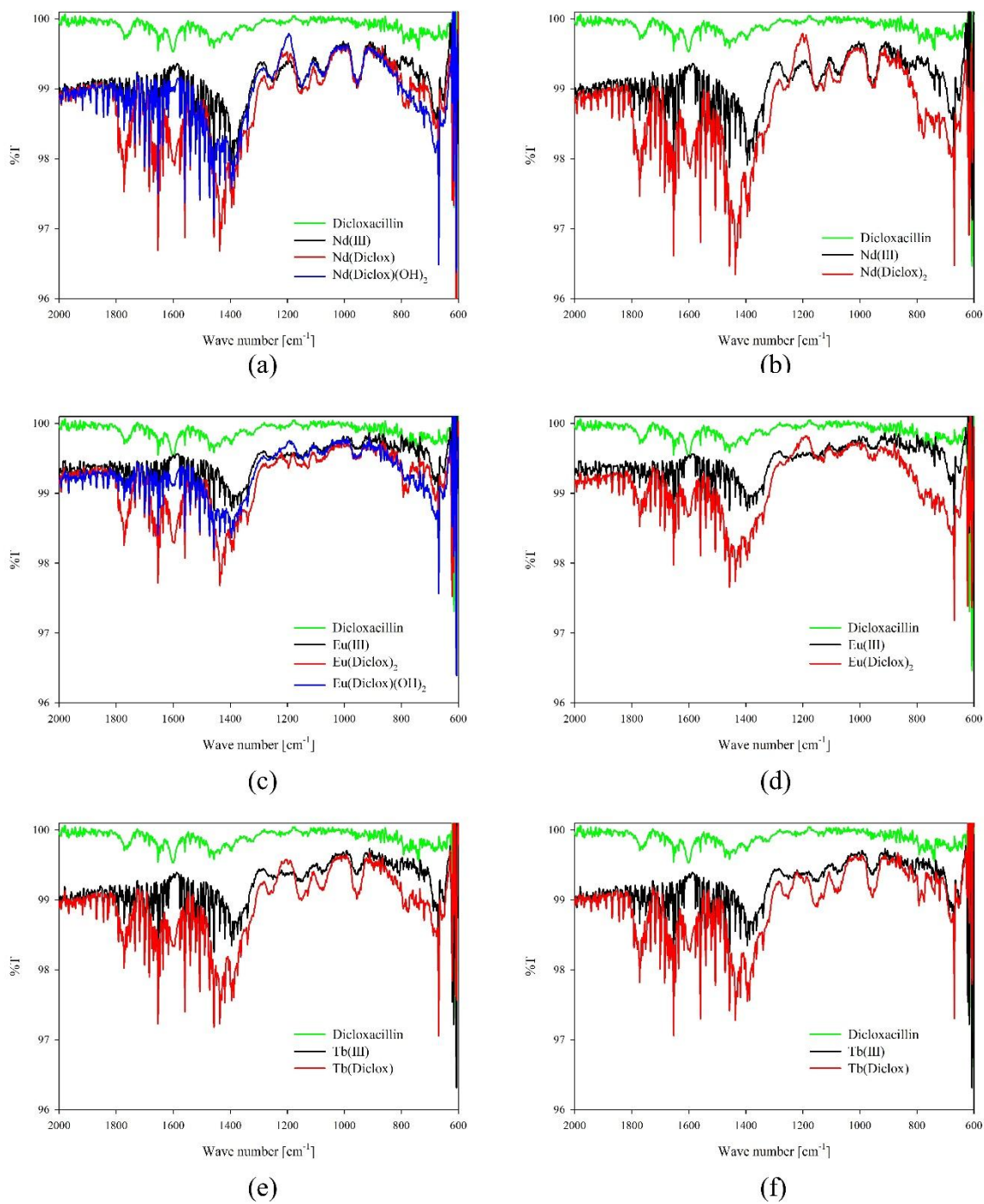


Figure S4. IR spectra of (a) Nd(III)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (b) Nd(III)/Dicloxacillin (1:2 ratio); (c) Eu(III)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (d) Eu(III)/Dicloxacillin (1:2 ratio); (e) Tb(III)/Dicloxacillin (1:1 ratio); (f) Tb(III)/Dicloxacillin (1:2 ratio).

Imię i nazwisko:

Justyna Frymark

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution, 2026, Sci. Rep. (in press).

Autorzy publikacji:

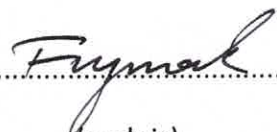
Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Małgorzata T. Kaczmarek, Renata Jastrząb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji *"Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution"* mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, realizacji badań eksperymentalnych, przeprowadzeniu analizy formalnej, zarządzaniu danymi badawczymi, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, udziale w redakcji i korekcie manuskryptu, opracowaniu wizualizacji wyników, sprawowaniu nadzoru nad realizacją badań oraz administracji projektem.

Poznań 26.06.2026

(miejsce i data)


(podpis)

Imię i nazwisko:

Dr Michał Zabiszak

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution, 2026, Sci. Rep. (in press).

Autorzy publikacji:

Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Małgorzata T. Kaczmarek, Renata Jastrząb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji *“Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution”* mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, współtworzeniu metodologii badań, udziale w walidacji wyników, przeprowadzeniu analizy formalnej, zarządzaniu danymi badawczymi, udziale w redakcji i korekcie manuskryptu, opracowaniu wizualizacji wyników oraz sprawowaniu nadzoru nad realizacją badań.

Poznań, 26.06.2026

(miejsce i data)

Zabiszak

(podpis)

Imię i nazwisko:

Prof. UAM dr hab. Małgorzata T. Kaczmarek

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution, 2026, Sci. Rep. (in press).

Autorzy publikacji:

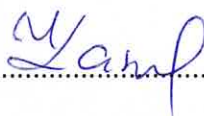
Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Małgorzata T. Kaczmarek, Renata Jastrząb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji *“Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution”* mój udział polegał na przeprowadzeniu analizy formalnej oraz udziale w redakcji i korekcie manuskryptu.

Poznań, 26.06.26

(miejsce i data)


.....
(podpis)

Imię i nazwisko:

Prof. dr hab. Renata Jastrzęb

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo / wydawnictwo, tom, strony:

Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution, 2026, Sci. Rep. (in press).

Autorzy publikacji:

Justyna Frymark, Michał Zabiszak, Małgorzata T. Kaczmarek, Renata Jastrzęb

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji *“Metal–antibiotic interactions: potentiometric and spectroscopic investigation of cloxacillin and dicloxacillin complexes in aqueous solution”* mój udział polegał na współtworzeniu metodologii badań, udziale w walidacji wyników, zapewnieniu zasobów do realizacji projektu, udziale w redakcji i korekcie manuskryptu, sprawowaniu nadzoru nad realizacją badań oraz pozyskaniu finansowania badań.

Poznań 26.06.2026

(miejsce i data)



(podpis)