



Benedetto Natalini, Roccaldo Sardella, Federica Ianni Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco Università di Perugia natalini@chimfarm.unipg.it

## CROMATOGRAFIA CHIRALE A SCAMBIO DI LIGANDI. UNA VECCHIA TECNICA PER NUOVI STUDI COMPUTAZIONALI

Con l'impiego di tre selettori chirali adsorbiti idrofobicamente sono stati effettuati studi descrittivi del rapporto struttura/separazione di α-amminoacidi. Con un selettore chirale in fase mobile è stato razionalizzato l'ordine di eluizione degli enantiomeri e l'influenza del tipo di sale di rame per mezzo di approcci statistici e calcoli quanto-meccanici.

I meccanismo di enantioseparazione basato sullo scambio di ligandi è stato introdotto da Vadim A. Davankov tra la fine degli anni Sessanta e l'inizio degli anni Settanta [1]. Ispirato dagli esperimenti del padre sull'isolamento di oro ed uranio dall'acqua di mare per mezzo della cromatografia a scambio ionico, Davankov iniziò nel 1962 a sintetizzare resine chirali a scambio ionico, che, utilizzate come fase stazionaria in colonne cromatografiche, fornirono solo un parziale arricchimento enantiomerico con amminoacidi racemici. Successivamente, egli stesso trovò la soluzione vincente per un'efficace ed efficiente enantioseparazione coinvolgendo nell'interazione selettore-analita un metallo di transizione, ad esempio il rame. Infatti, con una resina di polistirene su cui era stata legata la (*S*)-prolina come selettore chirale ed in presenza di ioni Cu(II), l'eluizione con acqua della prolina racemica produsse solo (*S*)-prolina, mentre per eluire l'isomero *R* fu necessaria una soluzione di ammoniaca. Questo primissimo esperimento aprì le porte alla cromatografia chirale a scambio di ligandi (*Chi*- ral Ligand-Exchange Chromatography, CLEC), offrendo così la prima metodologia di separazione completa di enantiomeri commercialmente disponibile. Moltissimi amminoacidi racemici possono essere facilmente separati nei due enantiomeri per mezzo della (*S*)-prolina supportata su resina; questa fase stazionaria chirale si è dimostrata, inoltre, efficace anche nel separare racemati di altre classi, come  $\alpha$ -idrossiacidi, amminoalcooli, 1,2-diammine, 1,2-dioli,  $\beta$ -amminoacidi e recentemente chinoloni [2-5].

Lo scambio di ligandi costituisce quindi un approccio generale valido in tutti quei casi in cui l'analita è una specie capace di chelare metalli di transizione, in particolare il rame, con cui realizza complessi termodinamicamente stabili e cineticamente labili, prerequisito essenziale per il successo del processo cromatografico. L'interazione tra il selettore chirale e l'enantiomero non avviene quindi direttamente, ma è mediata da un catione centrale [Cu(II)], che come acido di Lewis coordina simultaneamente le due specie attraverso legami dativi, con la conseguente formazione di complessi ternari misti. L'assenza del contatto diretto selettore-analita, come pure la presenza di un catione metallico nell'ambiente cromatografico contribuiscono tuttavia alla difficoltà di razionalizzazione dell'evento cromatografico, specialmente se si impiegano approcci computazionali.

Tra le tecniche di separazione cromatografica di enantiomeri, lo scambio di ligandi è stato realizzato in tutti e tre i possibili modi: fase mobile chirale (*Chiral Mobile Phase*, CMP) (eq. 1):

fase stazionaria chirale legata covalentemente (*Bonded Chiral Stationary Phase*, B-CSP) oppure stratificata dinamicamente sul supporto solido, generalmente funzionalizzato con catene ottadeciliche (*Coated Chiral Stationary Phase*, C-CSP) (eq. 2):

Fase Stazionaria  $A^{s} + MC^{s} + C^{s} \xleftarrow{K^{M}AMC} AMC^{s}$ 

dove A, M e C rappresentano l'analita, il metallo ed il selettore chirale, rispettivamente; gli apici s e m indicano la collocazione delle specie rispettivamente nella fase mobile e stazionaria; mentre K rappresenta la costante di equilibrio del processo di complessazione.

Oltre che la (S)-prolina, numerose altre specie chelanti, caratterizzate da un diverso profilo chimico-fisico, sono state valutate come selettori CLEC. Fra questi, una particolare rilevanza è riservata ad un gruppo di amminoacidi comprendenti idrossiprolina, cisteina, istidina, fenilalanina, valina, lisina, isoleucina e penicillammina e pochi amminoalcooli caratterizzati dalla presenza di un residuo di fenilglicinolo o leucinolo. Sebbene le prime colonne chirali commercialmente disponibili siano state quelle basate sulla teoria dello scambio di ligandi, gli aspetti meccanicistici riguardanti il meccanismo di riconoscimento chirale ed il processo di separazione cromatografica in ambienti CLEC sono stati tra i meno studiati, in gran parte per la complessità dei modelli teorici di riferimento. Recentemente, questa difficoltà ha tuttavia stimolato diversi approcci computazionali volti a chiarire il meccanismo di interazione ed a indicare i parametri principali che descrivono l'analita, responsabili del processo di enantioriconoscimento [6].

Nel panorama che descrive le fasi stazionarie chirali, quelle basate sullo scambio di ligandi occupano uno spazio molto piccolo (Fig. 1): la parte del leone la fanno le varie polisaccaridiche, basate su cellulosa e amilosio.

Perché allora impiegare la cromatografia chirale a scambio di ligandi? Nel nostro caso, la ragione alla base della scelta di questo tipo di cromatografia chirale è legata allo sviluppo di uno dei principali temi di ricerca del gruppo: progettazione, disegno e sintesi di modulatori delle vie glutammatergiche. La ricerca in questo campo ci ha portato alla sintesi di un grande numero di amminoacidi, molti di essi analoghi a conformazione ristretta dell'acido glutammico. Per le loro capacità chelanti, gli amminoacidi sono ligandi elettivi per l'ambiente CLEC: nei diagrammi di flusso relativi alla selezione della fase stazionaria chirale idonea alla separazione desiderata, se l'analita è in grado di legare il rame, allora la tecnica cromatografica di scelta è lo scambio di ligandi [7]. E nella separazione e risoluzione enantiomerica di uno dei primi amminoacidi sintetizzati, l'acido 1-amminoindan-1,5-dicarbossilico (AIDA), tra tutti i tentativi fatti per la separazione degli enantiomeri, solo la cromatografia chirale a scambio di ligandi ha permesso di separare e risolvere, anche a livello preparativo, la miscela racemica proveniente dalla sintesi [8].

AIDA è largamente impiegato come *tool* farmacologico di investigazione, essendo l'antagonista più potente e selettivo dei recettori metabotropici del glutammato del gruppo I [8].

Diversi studi iniziali sono stati fatti impiegando come selettore chirale in fase mobile la *N*,*N*-dimetil-(*S*)-fenilalanina (*S*)-DMP, Fig. 2a) [8-10]. Successivamente, abbiamo introdotto e sviluppato l'impiego di altri





selettori chirali tra cui la O-benzil-(S)-serina (S)-OBS, Fig. 2b) [11,12] e quelli basati sulla cisteina: S-benzil-(*R*)-cisteina (*R*)-SBC, Fig. 2c) [13,14], S-difenilmetil-(*R*)-cisteina (*R*)-SDC, Fig. 2d) [15], S-tritil-(*R*)-cisteina (*R*)-STC, Fig. 2e) [14-16]. Mentre la (S)-OBS è stata impiegata per formare una fase mobile chirale, la vasta area idrofobica costituita dall'insieme della porzione aromatica (benzil/benzidril/tritil) e dall'atomo di zolfo nei tre selettori basati sulla cisteina permette in tutti e tre i casi il legame idrofobico alle catene C-18 della colonna a fase inversa, costituendo così una fase stazionaria chirale in cui il selettore è stratificato dinamicamente sulla superficie ottadecilsilicea. Il *coating* dinamico ottenuto con questi tre selettori garantisce una durata della fase stazionaria in qualche modo proporzionale all'entità dell'interazione idrofobica: una, due o quattro settimane in funzione di uno, due e tre anelli aromatici nella catena laterale.





Fig. 2 - Seletton chirali implegati: a) N,N-dimetir-(S)-fenilalanina, (S)-DMP, b) O-benzil-(S)-serina (S)-OBS, c) S-benzil-(R)-cisteina (R)-SBC, d) S-difenilmetil-(R)-cisteina (R)-SDC, e) S-tritil-(R)-cisteina (R)-STC

> Le migliori prestazioni cromatografiche sono state quasi sempre ottenute con la (R)-STC (Fig. 2e): il coating dinamico, inoltre, facilita il recupero dell'analita nel caso di uno scale-up semi-preparativo, e permette di sostituire il selettore chirale o ripristinare la fase inversa originaria per semplice lavaggio della colonna con un solvente organico come l'acetonitrile. Con l'impiego dei selettori chirali sopra citati abbiamo condotto i nostri studi computazionali: gli sviluppi recenti sono rivolti all'elaborazione di tre tematiche, una riguardante una metodologia di classificazione mirante a razionalizzare l'enantioseparazione, la seconda riguardante l'ordine di eluizione degli enantiomeri e la terza con obiettivo di valutare l'influenza dell'anione rameico sulla prestazione cromatografica. La metodologia statistica di classificazione (classification analysis) serve

> per costruire alberi decisionali (*decision trees*) utili per interpretare il meccanismo di separazione cromatografica [17].

> Un albero decisionale classifica dati attraverso una serie di domande su specifiche caratteristiche relative agli oggetti considerati. Ogni domanda costituisce un nodo ed ogni possibile risposta genera nodi successivi: le domande quindi, formano una sequenza gerarchica codificata come albero.

> Lo scopo principale della nostra analisi computazionale è quello di dedurre quali proprietà dell'analita o del complesso ternario che lo contiene influenzano principalmente il processo di enantioriconoscimento con i suddetti sistemi CLEC. Alberi decisionali sono stati impiegati con successo nella Biologia compu

tazionale e Bioinformatica [18-20] per la loro utilità nell'associare tipi diversi di dati al fine di produrre previsioni accurate, come ad esempio predire interazioni genetiche, o meccanismi di regolazione genica.

Nel nostro caso, abbiamo selezionato 32 coppie di amminoacidi (costituenti un *training set*) e abbiamo registrato i fattori di ritenzione (k) ed il fattore di separazione ( $\alpha$ ) con ognuno dei tre selettori basati sulla cisteina (Fig. 2c-e). (*R*)-STC ha sempre fornito le migliori prestazioni in termini di enantioseparazione. Quindi, con i valori  $\alpha$  delle 32 coppie del *training set* sono state costruite 2 classi: alla classe 1 appartengono le coppie non discriminate ( $\alpha$ =1), mentre alla classe 2 appartengono le coppie discriminate dal selettore ( $\alpha$ >1): studi separati sono stati fatti su due gruppi composti dai soli enantiomeri *R* o *S*.

Per ogni enantiomero sono stati poi calcolati 40 descrittori molecolari [21, 22], descrittori che dipendono dalla configurazione e conformazione dell'analita.

Con (*R*)-SBC (Fig. 1c) due differenti descrittori (*Fractional Negatively Charged Partial Surface Area*, FNSA-3 e *Relative Polar Surface Area*, RPSA) sono risultati idonei a classificare con buona accuratezza la prestazione cromatografica: entrambi testimoniano per un'attività discriminante di (*R*)-SBC attraverso una marcata influenza di interazioni polari, a cui può contribuire la capacità di accettore di legami a idrogeno dell'atomo di zolfo. Nella Fig. 3a vengono evidenziati i due *splitting node* per i gruppi degli enantiomeri *R* ed *S* e riportate le predizioni incorrette in percentuale: nel grafico di Fig. 3b sono riportate le stesse informazioni con l'indicazione di due *outliers* ed un *borderline*.

La stessa procedura è stata applicata al secondo selettore, (*R*)-SDC: in questo caso, per entrambi i gruppi di enantiomeri il descrittore molecolare che meglio soddisfa il comportamento cromatografico è TASA (*Total Hydrophobic Surface Area*), indicando una marcata influenza dell'interazione idrofobica tra selettore ed analita. Nella Fig. 3c sono riportati gli *splitting nodes* e la relativa accuratezza nella predizione, mentre nel plot (Fig. 3d) sono evidenziati, oltre agli *splitting nodes*, anche 3 *outliers* ed 1 *borderline*. Con il terzo selettore, (*R*)-STC, entrambe le serie di enantiomeri sono correttamente classificate dal descrittore molecolare PPSA-1 (*Partial Positive Surface Area*), così indicando il ruolo preminente dell'interazione elettroni  $\pi$ /superficie positiva dell'analita. La Fig. 3e,f illustra il risultato dello studio di classificazione in modo analogo ai due casi precedenti.

Con l'impiego di un set di validazione esterno abbiamo testato la qualità della nostra metodologia. Anche in questo caso, abbiamo osservato la presenza di due falsi positivi che, come gli *outliers* precedenti, sono caratterizzati dalla presenza di gruppi distali che possono legare il rame. Poiché la procedura di classificazione prevede il calcolo delle cariche nei complessi in esame, sarà utile modificare la procedura sperimentale prevedendo di fissare il pH di calcolo in modo da aderire ulteriormente all'ambiente cromatografico adottato e, quindi, esaltare il contributo al legame dativo da parte di idonee funzionalità sulla catena laterale.

Con il selettore (S)-OBS (Fig. 2b) impiegato in soluzione eluente abbiamo effettuato studi computazionali per esaminare quali parametri



Fig. 4 - Modello di *decision tree*. Classificazione dei composti del *training set* in accordo con il relativo comportamento cromatografico, attraverso il descrittore che codifica la differenza dell'energia di solvatazione all'interno di una coppia diastereoisomerica (Delta-E<sub>sol</sub>). Per ogni nodo sono specificati il valore di cut-off (tra parentesi quadre), il numero di oggetti (dimensione, %) e l'omogeneità all'interno di ogni classe (purezza)

molecolari possono influenzare l'ordine di eluizione di amminoacidi [12]. I complessi ternari costruiti con gli enantiomeri di 25 amminoacidi sono stati ottimizzati a livello quanto-meccanico. I risultati ottenuti mostrano che l'ordine di eluizione non è spiegabile solo su base energetica: la sola differenza nelle energie quanto-meccaniche di coppie di complessi diastereoisomerici ( $\Delta$ QM) non spiega completamente il comportamento cromatografico osservato.

Abbiamo quindi preso in considerazione un *pool* di 112 descrittori 3D a cui abbiamo aggiunto anche il valore di  $\Delta$ QM per un totale di 113 variabili: un'analisi PCA ha poi permesso di selezionare un gruppo di analiti da impiegare come *test set* distinto dal *training set*. Per ogni descrittore, la differenza dei valori ottenuti per i complessi contenenti l'enantiomero *S* e l'enantiomero *R* ha permesso di costruire un albero decisionale (*decision tree*). Nella Fig. 4 viene mostrata la migliore classificazione e cioè quella ottenuta con il descrittore Delta-E<sub>sol</sub>, un descrittore che codifica la differenza dell'energia di solvatazione all'interno di una coppia diastereoisomerica. Tale descrittore è, quindi, una misura della differenza nel bilancio idrofobico/idrofilico di ogni coppia diastereoisomerica, che determina la loro diversa ripartizione fra la fase mobile e quella stazionaria.

In accordo a considerazioni precedenti [3], viene quindi confermato che la valutazione dell'energia di associazione nei due complessi non è da sola sufficiente a spiegare l'evento CLEC in sistemi CMP: vanno considerati necessariamente anche altri parametri, come la solvatazione e, quindi, l'interazione con la fase stazionaria. Una procedura di validazione basata sul metodo *"leave-one-out"* ha confermato Delta- $E_{sol}$  come descrittore selezionato, lasciando il valore di *splitting node* praticamente invariato. Solo AIDA non viene correttamente classificato: è possibile che vi sia una sottostima di Delta- $E_{sol}$  a causa della rigidità strutturale dell'analita e/o per l'assenza dell'idrogeno sul carbonio amminoacidico.

Tra i parametri che influenzano la cromatografia a scambio di ligandi,





Fig. 5 - Generazione di nuovi descrittori, derivati dalla differenza fra gli scores del sistema di riferimento (Sis-1) e quelli dei sistemi Sis-2 e Sis-3

l'anione del rame non era mai stato chiaramente preso in esame: in un lavoro era stato anzi considerato praticamente ininfluente. In un paio di occasioni precedenti [23], noi avevamo già messo in evidenza che con (R)-SBC [13], (R)-STC [16] e (S)-OBS [11] l'anione del sale di rame influenza notevolmente il comportamento cromatografico sia in ambiente C-CCP che CMP: nelle condizioni sperimentali impiegate, il nitrato offre la migliore prestazione. E questo non è insolito: numerosi studi dimostrano l'influenza dell'anione nel modulare la proprietà del catione [24]. Sulla base di queste evidenze, abbiamo approfondito l'indagine utilizzando 9 sali di rame idrosolubili e 10 amminoacidi racemici per uno studio di classificazione diverso dal precedente, impiegando (S)-OBS come selettore chirale in modalità CMP [25]. Così, mentre in precedenza il raggruppamento lo creava il descrittore molecolare considerando un'unica condizione sperimentale, ora la possibile presenza di clusters comportamentali viene messa in evidenza attraverso la variazione delle condizioni d'analisi. La procedura prevede di stabilire un set di condizioni sperimentali (concentrazione del sale di rame, temperatura) che costituiscono il sistema di riferimento (Sistema 1), con il quale si registrano i fattori di ritenzione enantiomerica k1 e k2

(relativi, rispettivamente, al primo e secondo complesso diastereoisomerico eluito) ed il corrispondente fattore di separazione  $\alpha$ ; successivamente, la variazione della concentrazione del sale o della temperatura della colonna portano all'ottenimento di altri due sistemi (Sistema 2 e 3).

Anche con queste condizioni, vengono registrati i suddetti fattori termodinamici. Il trattamento statistico dei dati consiste nella costruzione di differenti matrici, una per ogni parametro cromatografico considerato (Fig. 5). Per k<sub>1</sub>, i risultati ottenuti con il sistema di riferimento sono contenuti nella griglia indicata come Sis-1 (Fig. 5), mentre Sis-2 e Sis-3 riportano i risultati ottenuti con la prima (concentrazione) e la seconda (temperatura) variazione sperimentale. Un'analisi delle componenti principali (PCA) viene poi derivata dal Sis-1 (PC-1) e consente di ottenere gli scores relativi al Sis-1. Le due proiezioni su PC-1 dei valori contenuti in Sis-2 e Sis-3 consentono di ottenere gli scores dei due sistemi caratterizzati da condizioni sperimentali variate. Così, un nuovo set di descrittori numerici derivati dalla differenza fra gli scores del sistema di riferimento (Sis-1) e quelli dei sistemi Sis-2 e Sis-3, consente di ottenere una serie di valori in grado di evidenziare una clusteriz-

Fattore di ritenzione k <sub>1</sub>				Fattore di ritenzione k <sub>2</sub>				Fattore di separazione α			
Sale	Eff-Conc	Eff-Temp	Cls	Sale	Eff-Conc	Eff-Temp	Cls	Sale	Eff-Conc	Eff-Temp	Cls
Cu(HCOO) <sub>2</sub>	0.22	0.79	1	Cu(HCOO) <sub>2</sub>	1.66	1.32	1	Cu(HCOO) <sub>2</sub>	0.27	0.22	1
Cu(Otf) <sub>2</sub>	0.46	1.86	1	Cu(Otf) <sub>2</sub>	0.5	2.61	1	Cu(Otf) <sub>2</sub>	0.02	0.28	2
CuCl <sub>2</sub>	0.05	1.14	1	CuCl <sub>2</sub>	0.23	1.84	1	CuCl <sub>2</sub>	0.12	0.32	1
CuF <sub>2</sub>	0.77	1.36	1	CuF <sub>2</sub>	1.95	2.19	1	CuF <sub>2</sub>	0.31	0.25	1
Cu(CF <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	-1.06	0.45	2	Cu(CF <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	-1.36	0.86	2	Cu(CF <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	-0.21	0.16	2
CuBr <sub>2</sub>	-0.38	0.79	2	CuBr <sub>2</sub>	-0.36	1.32	2	CuBr <sub>2</sub>	0.02	0.21	2
Cu(CIO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	-0.67	0.73	2	Cu(CIO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	-0.7	1.19	2	Cu(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.00	0.23	2
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-0.37	0.41	2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-0.43	0.84	2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.04	0.17	2
CuSO <sub>4</sub>	-0.49	0.54	2	CuSO <sub>4</sub>	-0.6	0.89	2	CuSO <sub>4</sub>	-0.07	0.14	2
Fig. 6 - Clusterizzazione ottenuta per mezzo del metodo statistico KNN (K-Nearest Neighbour clustering)											

zazione, cioè una sorta di *grouping* ottenuto per mezzo di un metodo statistico chiamato KNN (*K-Nearest Neighbour clustering*).

Il risultato (Fig. 6) è la formazione di due gruppi di sali ben distinti sia con k<sub>1</sub> che con k<sub>2</sub>, mentre per  $\alpha$  viene prodotto un *outlier*: in questo caso, la meno soddisfacente classificazione è probabilmente legata alle ridotte variazioni nei valori di  $\alpha$  al variare delle condizioni sperimentali d'analisi.

Con lo scopo di razionalizzare la formazione dei due *clusters*, la struttura dei sali è stata ottimizzata a livello quanto-meccanico. Per mezzo del pacchetto Jaguar (Schrödinger Suite, 2010) è stato selezionato un *pool* di descrittori di tipo elettronico e sterico: la migliore spiegazione del *clustering* è fornita da un descrittore elettronico, *ESP-balance*, che codifica per la differenza nella distribuzione di carica nella struttura del sale. Potenziali elettrostatici relativi alla superficie molecolare sono stati largamente impiegati per spiegare interazioni non covalenti, anche in sistemi biologici [26-28]. Un test di validazione, pur limitato ad un solo sale stante la difficoltà a trovare sali di rame solubili in acqua (alle concentrazioni tipiche dei sistemi CLEC) e commercialmente disponibili, è stato fatto impiegando il tetrafluoborato rameico (CuBF<sub>4</sub>), ottenendo una corretta collocazione di *clustering*.

## Conclusioni

La CLEC è stata il primo metodo di cromatografia liquida capace di fornire la risoluzione enantiomerica. Il processo di separazione che la

## **Bibliografia**

- [1] V.A. Davankov, S.V. Rogozhin, J. Chromatogr., 1971, 60, 280.
- [2] V.A. Davankov, J. Chromatogr. A, 1994, 666, 55.
- [3] V.A. Davankov, Enantiomer, 2000, 5, 209.
- [4] V.A. Davankov, J. Chromatogr. A, 2003, 1000, 891.
- [5] B. Natalini *et al.*, Advances in Chromatography,
- Taylor & FrancisGroup, Boca Raton, FL, USA, 2011, 71.
- [6] B. Natalini, R. Sardella, Comprehensive Chirality, George Tranter Ed., Elsevier, 2012, in stampa.
- [7] I.W. Wainer, *Trends Anal. Chem.*, 1987, 6, 125.
- [8] B. Natalini et al., Chirality, 2004, 16, 314.
- [9] B. Natalini et al., J. Chromatogr. A, 2004, **1033**, 363.
- [10] R. Wernicke, J. Chromatogr. Sci., 1985, 23, 39.
- [11] B. Natalini et al., Curr. Anal. Chem., 2005, 1, 85.
- [12] B. Natalini et al., J. Chromatogr. A, 2010, 48, 7523.
- [13] B. Natalini et al., Chirality, 2006, **18**, 509.

caratterizza è il risultato di un complesso equilibrio di fattori derivanti, in larga parte, dalla peculiare interazione fra analita e selettore chirale. Sebbene fin dall'inizio del suo impiego era già evidente la difficoltà di una razionalizzazione completa del processo enantioseparativo, l'ultima decade ha visto emergere un sempre più proficuo sviluppo di protocolli computazionali volti a chiarire i principi di base del meccanismo CLEC, sia in ambienti CSP che CMP. A tal fine, gli approcci perseguiti possono essere raggruppati in accordo con la teoria che li distingue. Particolarmente interessanti sono quelli basati su modelli matematici, sulla modellizzazione molecolare e la serie di studi in grado di enfatizzare relazioni quantitative tra proprietà strutturali (di selettore e/o analiti) e parametri cromatografici (*Quantitative Structure-Property Relationship*, QSPR).

La nostra attività d'indagine è stata particolarmente rivolta a studi QSPR. Contemporaneamente allo sviluppo di nuovi selettori CLEC, i suddetti studi computazionali hanno contribuito a chiarire gli aspetti meccanicistici che ne caratterizzano il comportamento nella fase di riconoscimento molecolare. Ulteriori studi saranno condotti con lo scopo di migliorare il potere predittivo dei protocolli computazionali da noi sviluppati, contribuendo ad identificare il miglior selettore chirale da impiegare per l'enantioseparazione di specifici composti. Una particolare attenzione verrà rivolta al disegno di nuovi agenti enantiodiscriminanti ed alla selezione di una più proficua composizione del sistema eluente.

[14] B. Natalini <i>et al., J. Sep. Sci.,</i> 2008, <b>31</b> , 2395.
[15] B. Natalini et al., J. Chromatogr. B, 2008, 875, 108.
[16] B. Natalini et al., J. Sep. Sci., 2008, <b>31</b> , 696.
[17] C. Kingsford, S.L. Salzberg, Nat. Biotechnol., 2008, 26, 1011.
[18] M. Middendorf et al., Bioinformatics, 2004, 20, 232.
[19] J.E. Allen et al., Genome Biol., 2006, 7, S9.
[20] S.L. Wong et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2004, 101, 15682.
[21] D.T. Stanton, P.C. Jurs, Anal. Chem., 1990, 62, 2323.
[22] R.H. Roxburgh, P.C. Jurs, Anal. Chim. Acta, 1987, 199, 99.
[23] M. Remelli et al., J. Chromatogr. A, 1997, 761, 79.
[24] V. Diniz, B. Volesky, Water Res., 2005, 39, 2229.
[25] B. Natalini, 18th International Symposium on Electro- and Liquid
Phase-Separation Techniques, Tbilisi (Georgia), 2011, 76.
[26] T. Brinck et al., J. Org. Chem., 1993, 58, 7070.
[27] P. Politzer et al., Int. J. Quantum Chem., 2001, 85, 676.
[28] N.E. Ghermani et al., J. Phys. Chem., 1994, <b>98</b> , 6287.

## Chiral Ligand-Exchange Chromatography: an Old Technique for New Computational Studies

Descriptive structure-separation relationship studies have been profitably carried out to infer the molecular properties of  $\alpha$ -amino acids, mostly affecting the enantioseparation event with three coated cysteine-based CLEC phases. The relying upon the 'partition tree' statistical approach along with QM calculations has allowed to build-up a computational model enabling to explain the enantiomer elution order of  $\alpha$ -amino acids with a mobile phase consisting of a serine derivative. With the same CLEC system, the different chromatographic behaviour resulting from the use of diverse Cu(II) salts has been rationalized with a PCA procedure followed by an ab initio study.