

分子对接预测手性化合物在蛋白质固定相色谱柱上的保留行为

任旭东 夏冬辉 李 华*

(西北大学分析科学研究所 西安 710069)

摘 要 利用分子对接技术预测了2种蛋白质固定相分别与4对手性化合物的相互作用情况。结果表明,预测结合自由能(ΔG)的大小与对映体(R -(+)型和 S -(−)型)的出峰顺序一致;结合自由能差值的绝对值($\Delta(\Delta G)$)与实验分离因子(α)大小顺序一致。说明分子对接可以反映蛋白质对不同的手性化合物的识别能力和化合物 R -(+)型和 S -(−)型的出峰顺序。

关键词 蛋白质固定相,手性分离,对映体,分子对接

中图分类号:O658.9

文献标识码:A

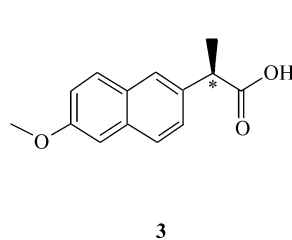
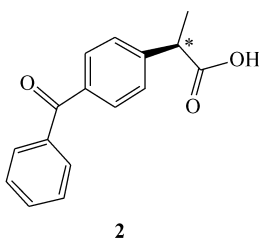
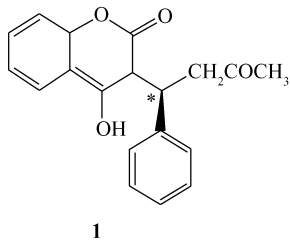
文章编号:1000-0518(2012)11-1324-05

DOI:10.3724/SP.J.1095.2012.00569

很多手性化合物具有特定的药效、生物活性及代谢功能等,但其药效常常仅由一种消旋体发挥,而另一种消旋体的药效很小甚至具有毒副作用^[1]。如镇痛药萘普生其 S 构型的药效是 R 构型的28倍^[2];抗早孕反应药沙利度胺(又名反应停)其右旋体具有镇静作用而左旋体会导致婴儿畸胎^[3]。常用的手性分离方法^[4-5]有结晶拆分法、生物拆分法、萃取拆分法和色谱拆分法等。其中色谱拆分法中的蛋白质手性固定相(CSP)高效液相色谱(HPLC)以其拆分面广、柱效高和易于变化色谱条件等优点在各类分离方法中独树一帜^[6]。尤其是一些成型手性固定相商品柱的问世,进一步简化和方便了药物的拆分^[7-8]。但是此类商品柱价格昂贵,使用寿命短。如果能在运用蛋白质固定相HPLC进行对映体分离实验之前用计算模拟的方法先进行对映体的初选,选择出能够被有效分离的对映体再进行实验,将会提高柱子的利用率并节省成本。

分子对接(Molecular Docking)是依据配体与受体作用的“锁-钥原理”(lock and key principle)模拟配体与受体生物大分子的非共价相互作用的计算机模拟技术^[9]。常用的分子对接软件^[10-11]有AutoDock、Dock、FlexX和GOLD等。王舵^[12]运用分子对接模拟了色谱固定化配基与蛋白质的相互作用。夏冬辉等^[13]运用分子对接研究了 β 受体阻滞剂及其类似物毛细管电泳手性识别机理。而将分子对接技术用于手性对映体在蛋白质固定相色谱柱上的保留行为的预测目前尚未见报道。

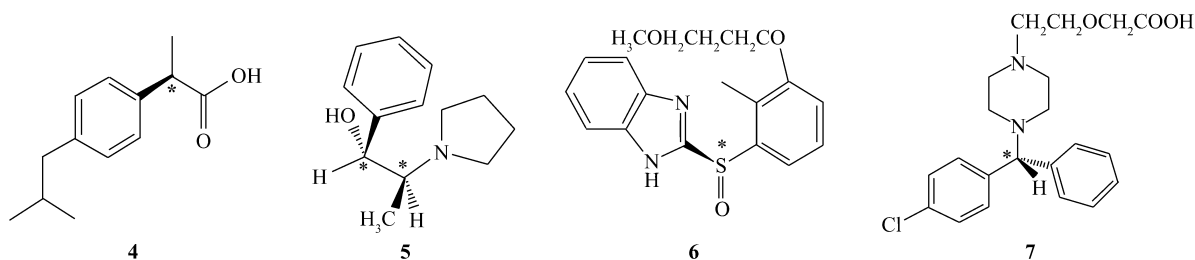
本文运用分子对接技术预测2种蛋白质固定相与多种手性化合物(Scheme 1)的相互作用情况,并研究其与色谱分离实验结果间的相关性。以期能为蛋白质固定相HPLC分离手性化合物提供依据。



2011-12-25 收稿,2012-03-07 修回

国家自然科学基金(20975081)资助项目,西北大学研究生创新基金交叉学科项目(09YJC18)

通讯联系人:李华,教授; Tel:029-88303527; Fax:029-88302635; E-mail:huali@nwu.edu.cn; 研究方向:生物分析化学及过程分析和功能体系的化学信息学



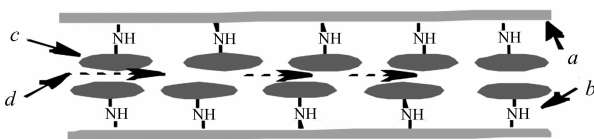
Scheme 1 Structures of chiral compounds

1~7: warfarin, ketoprofen, naproxen, ibuprofen, pyrrolidinylnorephedrine, rabeprazole, cetirizine

1 原理与方法

1.1 色谱热力学和手性分离原理

蛋白质手性分离柱如 Scheme 2 所示,先将硅胶表面活化,然后在硅烷表面键合一层可键合蛋白质的中间化合物(通常含有氨基),再通过化学键合(如偶联戊二醛法和三嗪法等)将蛋白质键合到中间化合物上制备而成^[14]。当手性小分子经过此色谱柱时,将与固定的蛋白质发生非共价键相互作用。不同旋光性的一对对映体一般与同种蛋白的结合模式和结合能不同,因此其色谱迁移时间有一定差别。利用此差别可实现手性化合物的拆分。依据色谱热力学原理,在色谱柱内存在以下平衡^[15]:



Scheme 2 Protein stationary phase column

a. surface of activated silicone; b. intermediate compound for linked protein with silicone(—NH—); c. protein; d. pre-separation molecular flow



式中,CSP 为蛋白质固定相, A^R 为右旋对映体, A^S 为左旋对映体。对于液相色谱,容量因子 k 与溶质对映体在流动相和固定相间可逆吸附的热力学常数 K 的关系为: $k = \varphi K$ (φ 指色谱柱相比)。对映体分离因子 $\alpha = k_2/k_1$ ($k_2 > k_1$)。色谱过程的自由能(单位 kJ/mol)变化可以表示为:

$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln (k/\varphi) \quad (1)$$

因此,可以推导出结合自由能差值的绝对值与分离因子的关系式为:

$$\Delta(\Delta G) = -RT \ln \alpha \quad (2)$$

1.2 分子对接原理

用来计算配体和受体间相互作用能和结合模式的分子模拟技术,同时考虑了分子间的几何构型和能量的匹配与识别能力。对于手性对映体,由于其几何构型不同(呈镜映对称),与蛋白质结合时有不同的匹配性质和结合能力,从而使对接结果中的结合能(ΔG)和结合模式有一定的差异。而蛋白质固定相 HPLC 就是利用手性化合物(S -(-)型和 R -(+)型)结合能的差异实现拆分的。因此,分析对接计算的结合能的差异,可以大体预测手性化合物的拆分情况。在 AutoDock4.2^[16]中采用半经验的自由能计算方法评价配体和受体之间的能量匹配关系。计算结合能的函数为:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{H-bond}} + \Delta G_{\text{sol}} + \Delta G_{\text{conform}} + \Delta G_{\text{tor}} \quad (3)$$

式中,前4项分别指范德华力、静电作用力、氢键相互作用力和疏水作用能, $\Delta G_{\text{conform}}$ 指背离实际键角和键长的偏差, ΔG_{tor} 为内部转动、全局转动和平动的限制。半经验结合自由能评价函数(ΔG)和蛋白质固定相与手性化合物相互作用的结合自由能可直接相关。

1.3 对接及参数设置

采用 ChemSktch 程序^[17]构建各种手性化合物三维分子模型,再用 GAMESS 软件^[18]在 DFT/B3LYP/6-31G* 水平进行能量最小化,获得能量最小构象。蛋白质晶体结构自 pdb 数据库(<http://www.pdb.org>)。

rcsb.org/pdb) 下载 (pdb ID:1HA2,1H9Z,2BXG,2VDB,3P6G),除去水分子等杂质分子,保存受体文件。对接使用 AutoDock4.2 程序,主要对接参数设置:对于 HSA 以小分子各自的结合位点的中心为格点中心,对于 α_1 -酸性糖蛋白以其质心为格点中心、格点盒子大小均为 50 点 $\times$ 50 点 $\times$ 50 点 (格点间距为 0.0375 nm)、对接算法选用拉马克遗传算法 (LGA)、其它参数为程序默认值,进行 50 次运算。在最佳聚类中选取优势的构象进行分析。

2 结果与讨论

HPLC 手性分离的效果主要取决于对映体出峰时间的长短和对映体间的出峰时间差。在蛋白质作固定相的 HPLC 手性分离柱中,对映体出峰时间主要取决于其与蛋白质的结合能,出峰时间差主要取决于两对映体与蛋白质的结合自由能的差值。分子对接技术通过计算对映体与蛋白质间的结合自由能的大小及推算其差值,能够直接反映蛋白质作固定相 HPLC 手性分离的结果。此外,HPLC 手性分离的效果在一定程度上还受到柱温、pH 值、缓冲溶液、有机改性剂和离子浓度等环境条件的影响。本文所用分子对接软件 AutoDock4.2 默认温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,pH 值为 7.0 的无水体系。结合软件参数要求及大量对接尝试,确定色谱条件为:pH 值为 7.0 ± 0.6 的磷酸缓冲溶液,柱温 (30 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ 和以乙腈作有机改性剂时对接结果与实验结果较吻合。对接结果与文献^[19-23]中的色谱分离数据间的相关性分析如下。

2.1 结合能 (ΔG) 与出峰顺序的相关性

当一对对映体经过蛋白质固定相时,结合能小的不易被洗脱,即出峰时间较晚。表 1 列出了蛋白质与对映体的对接结合能数据。由 8 对对映体的对接结合能大小可知,在人血清白蛋白柱中华法林和酮基布洛芬对映体的 *S*-(-) 型晚于 *R*-(+) 型出峰;而萘普生和布洛芬对映体的 *R*-(+) 型晚于 *S*-(-) 型出峰。在 α_1 -酸性糖蛋白柱中布洛芬、雷贝拉唑和西替利嗪的 *S*-(-) 型晚于 *R*-(+) 型出峰;而吡咯烷基苯丙醇胺的 *R*-(+) 型晚于 *S*-(-) 型出峰。此结果与文献^[19-23]中实验出峰顺序完全一致。这表明了分子对接技术能够正确反映上述色谱柱的对映体出峰顺序。

表 1 蛋白质与对映体的结合能 (ΔG)、结合能差 $\Delta(\Delta G)$ 和分离因子 (α)
Table 1 Binding energy (ΔG) of protein with enantiomers, binding energy difference $\Delta(\Delta G)$ and separation factor (α)

Chiral stationary phase	Chiral compounds	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$		$\Delta(\Delta G)/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$		Separation factor(α)
		<i>R</i> -(+)	<i>S</i> -(-)	Anticipated values	Experimental values	
Human Serum Albumin	warfarin	-27.71	-30.51	2.80	2.63 ^[19]	1.28
	ketoprofen	-34.23	-36.12	1.89	>1.46 ^[19]	>1
	naproxen	-37.33	-36.12	1.21	<1.46 ^[19]	<1
	ibuprofen	-30.72	-30.47	0.25	<1.46 ^[19]	<1
α_1 -acidoglycoprotein	ibuprofen	-21.11	-23.45	2.34	2.51 ^[20]	1.27
	pyrrolidinyl norephedrine	-24.91	-22.36	2.55	3.22 ^[21]	1.36
	rabeprazole	-25.67	-29.01	3.34	3.55 ^[22]	1.40
	cetirizine	-24.66	-29.51	4.85	6.52 ^[23]	1.87

2.2 结合能差 ($\Delta(\Delta G)$) 与分离因子 (α) 的相关性

色谱分离效果的判断标准之一是分离因子 (α)。当 $\alpha > 1$ 时,可以分离,且 α 越大,分离效果越好;当 $\alpha < 1$ 时,不能分离,且 α 越小,峰的重叠越严重。由式(1)和式(2), $\Delta(\Delta G)$ 与 α 成正比,且当 $\Delta(\Delta G)$ 约等于 1.46 时, α 约等于 1。由表 1 中人血清白蛋白与 4 种手性对映体华法林、酮基布洛芬、萘普生和布洛芬的结合自由能差值的绝对值的预测值 (依次为 2.80、1.89、1.21 和 0.25) 可以推断,人血清白蛋白柱可拆分华法林和酮基布洛芬,且对华法林的拆分效果最好,不可拆分萘普生和布洛芬。由 α_1 -酸性糖蛋白与 4 种手性对映体布洛芬、吡咯烷基苯丙醇胺、雷贝拉唑和西替利嗪的结合自由能差值的绝对值的预测值 (依次为 2.34、2.55、3.34 和 4.85) 可以推断, α_1 -酸性糖蛋白柱对这 4 种对映体均可拆分,且拆分能力依次为布洛芬 < 吡咯烷基苯丙醇胺 < 雷贝拉唑 < 西替利嗪。此结果与实验值的大小顺序一致。这表明了分子对接技术能够正确反映对映体分离的分离因子的大小顺序。

由于文献[19]中没有酮基布洛芬、萘普生和布洛芬结合能差的实验数据,此处用“大于 1.46”、“小于 1.46”表示其分离效果。由表 1 可知,预测结果仍与实验相符。其它 5 组对映体的结合自由能差值的绝对值的预测值与实验值数值均存在一定偏差。由于实验是在乙腈为有机改性剂的磷酸缓冲溶液中进行的,各对映体分子存在溶剂效应。而分子对接计算是在无水情况下模拟的,没有考虑溶剂效应。从而导致实验状态与对接计算状态下对映体分子的电荷密度间存在差别,从而影响了蛋白质固定相与对映体之间的相互作用,使分子对接计算值与实验测定值间存在一定的偏差。进一步考察温度对蛋白质固定相与对映体之间相互作用的实验结果表明,吡咯烷基苯丙醇胺和西替利嗪在 (30 ± 5) °C 时受温度的影响较大,因此这 2 组对映体的预测值与实验值间的偏差较大。但是这种数值上的偏差并不影响对出峰顺序及分离因子大小顺序的判断。

3 结 论

运用分子对接技术预测了人血清白蛋白、 α_1 -酸性糖蛋白分别与 4 组手性化合物的相互作用情况,并研究了预测的结合自由能与对映体出峰顺序和分离因子等色谱数据间的相关性。结果表明,预测的结合自由能的大小与对映体出峰顺序一致;结合自由能差值的绝对值与实验分离因子大小顺序一致。表明分子对接技术可以反映蛋白质对不同的手性化合物的识别能力和化合物的出峰顺序,可能为以蛋白质作固定相的 HPLC 手性分离实验进行初步筛选,节省研究时间和成本。期待开发出考虑因素更全面、更精确的分子对接技术及软件。

参 考 文 献

- [1] YANG Yana. Studies of Separation of Chiral Ion-pair Chromatography for Separation of Chiral Drugs [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, 2006 (in Chinese).
杨亚娜. 手性离子对色谱法分离手性药物的研究[D]. 上海:上海医药工业研究院, 2006.
- [2] Ohta T, Takaya H, Kitamura M, *et al.* Asymmetric Hydrogenation of Unsaturated Carboxylic Acids Catalyzed by BINAP-ruthenium(II) Complexes[J]. *Org Chem*, 1987, **52**(14): 3174-3176.
- [3] DU Canping, LIANG Wenping, TANG Jin. Research on Chemistry and Biology of Chiral Drugs[J]. *Prog Chem*, 2002, **14**(2): 156-158 (in Chinese).
杜灿屏, 梁文平, 唐晋. 手性药物的化学与生物学研究[J]. 化学进展, 2002, **14**(2): 156-158.
- [4] LIN Xiuli. Chiral Drugs and Capillary Electrophoresis [D]. Dalian: Dalian Chemical Physics Research Institute, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese).
林秀丽. 手性药物和毛细管电泳分离[D]. 大连:中国科学院大连化学物理研究所, 2001.
- [5] LU Dingqiang, LI Yanliang, LING Xiuquan, *et al.* Technical Progress on the Chiral Drug Resolutions [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2009, **20**(7): 1731-1734 (in Chinese).
卢定强, 李衍亮, 凌岫泉, 等. 手性药物拆分技术的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, **20**(7): 1731-1734.
- [6] HOU Jingguo, CHEN Liren, OU Qingyu. Protein-Based Chiral Stationary Phase in High Performance Liquid Chromatography [J]. *Chinese J Anal Chem*, 1996, **24**(10): 1227-1232 (in Chinese).
侯经国, 陈立仁, 欧庆瑜. 高效液相色谱蛋白质类手性固定相[J]. 分析化学, 1996, **24**(10): 1227-1232.
- [7] ZHANG Lingxia, LIU Jing, HU Yuzhu. The Resolution of Enantiomeric Drugs Using Protein as Chiral Stationary Phase in HPLC [J]. *Prog Pharm Sci*, 2001, **25**(1): 1-4 (in Chinese).
张灵霞, 刘静, 胡育筑. 高效液相色谱中的蛋白质类手性固定相[J]. 药学进展, 2001, **25**(1): 1-4.
- [8] Haginaka J. Protein-Based Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography Enantioseparations [J]. *J Chromatogr A*, 2001, **906**(1/2): 253-273.
- [9] ZHAO Liqin, XIAO Junhai, LI Song. Molecular Docking for in Structure-Based Drug Designing [J]. *Acta Biophys Sin*, 2002, **18**(3): 263-270 (in Chinese).
赵丽琴, 肖军海, 李松. 分子对接在基于结构药物设计中的应用[J]. 生物物理学报, 2002, **18**(3): 263-270.
- [10] Wang R X, Lu Y P, Wang S M. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking [J]. *J Med Chem*, 2003, **46**(12): 2287-2303.
- [11] Charifson P S, Corkery J J, Murcko M A, *et al.* Consensus Scoring: A Method for Obtaining Improved Hit Rates from Docking Databases of Three-Dimensional Structures into Proteins [J]. *J Med Chem*, 1999, **42**(25): 5100-5109.
- [12] WANG Duo. Computer-Aided Simulations of the Interactions between Immobilized Ligands and Proteins [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2008 (in Chinese).

- 王舵. 固定化配基与蛋白质相互作用的计算机模拟[D]. 大连:大连理工大学,2008.
- [13] XIA Donghui, SHANG Yonghui, LI Hua. Molecular Docking Studies of β -Receptor Blocker and Its Analogues of Capillary Electrophoresis Chiral Recognition Mechanism[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2011, **39**(3):414-418(in Chinese).
夏冬辉, 尚永辉, 李华. 分子对接研究 β -受体阻滞剂及其类似物毛细管电泳手性识别机理[J]. 分析化学, 2011, **39**(3):414-418.
- [14] FENG Shun. Preparation of Bovine Serum Albumin and Human Serum Albumin Chiral Stationary Phases and the Study of Their Properties[D]. Urumuqi: Xinjiang University, 2000(in Chinese).
封顺. 牛血清白蛋白与人血清白蛋白键合液相手性固定相的制备及其性质的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2000.
- [15] FANG Huiqun, YU Junsheng. Equipment Analysis[M]. Beijing: Science Press, 2002(in Chinese).
方惠群, 于俊生. 仪器分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] Huey R, Morris G M, Olson A J, *et al.* A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation[J]. *J Comput Chem*, 2007, **28**(6):1145-1152.
- [17] Freitas M P. MIA-QSAR Modelling of Anti-HIV-1 Activities of Some 2-Amino-6-arylsulfonylbenzonitriles and Their Thio and Sulfinyl Congeners[J]. *Org Biomol Chem*, 2006, **4**(6):1154-1159.
- [18] Kerzmann A, Neumann D, Kohlbacher O. SLICK-Scoring and Energy Functions for Protein-Carbohydrate Interactions[J]. *J Chem Inf Model*, 2006, **46**(4):1635-1642.
- [19] WANG Hailin, ZOU Hanfa, LV Meiling, *et al.* Enantiomeric Separation of Drug on Human Serum Albumin Column[J]. *Chinese J Anal Chem*, 1998, **26**(1):68-72(in Chinese).
汪海林, 邹汉法, 吕美玲, 等. 人血清白蛋白柱上药物的手性拆分[J]. 分析化学, 1998, **26**(1):68-72.
- [20] YANG Ling, RAN Guimei, ZHANG Caihua, *et al.* Enantiomeric Separation of Ibuprofen by HPLC Using α -Acid Glycoprotein Chiral Stationary Phase[J]. *J Shenyang Pharmaceut Univ*, 2004, **21**(4):279-281(in Chinese).
杨凌, 冉桂梅, 张才华, 等. α -酸性糖蛋白柱拆分布洛芬对映体[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, **21**(4):279-281.
- [21] Yehl P M, O'Brien T P, Moeder C W, *et al.* Mechanisms of Retention of Pyrrolidinyl Norephedrine on Immobilized α_1 -Acid Glycoprotein[J]. *Chirality*, 2000, **12**(3):107-113.
- [22] JIN Wei, YANG Yongjian, PENG Xingsheng, *et al.* Direct Enantiomeric Separation of Rabeprazole on α -Acid Glycoprotein Chiral Column[J]. *Chinese J Pharm Anal*, 2006, **26**(12):1715-1717(in Chinese).
金薇, 杨永健, 彭兴盛, 等. 雷贝拉唑对映体在 α -酸性糖蛋白柱上的手性拆分[J]. 药物分析杂志, 2006, **26**(12):1715-1717.
- [23] ZHANG Zhefeng, YANG Gengliang, LIANG Guijian, *et al.* Study on the Enantiomer Separation of Cetirizine Dihydrochloride Using Proteinate- and Amylose-based Chiral Stationary Phase[J]. *Acta Pharm Sin*, 2004, **39**(3):204-207(in Chinese).
张哲峰, 杨更亮, 梁贵键, 等. 蛋白质及纤维素衍生物手性固定相分离盐酸西替利嗪对映体[J]. 药学报, 2004, **39**(3):204-207.

Prediction of the Retention Behavior of Chiral Compounds in Protein Stationary Phase Column Using Molecular Docking

REN Xudong, XIA Donghui, LI Hua*

(Institute of Analytical Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract The molecular docking techniques were used for predicting the interactions of two chromatographic stationary phase proteins with four pairs of chiral compounds, respectively. The results showed that the order of predicted binding free energies(ΔG) were consistent with the experimental order of chromatographic elution peaks (R -(+) and S -(−) type). Furthermore, the order of the absolute value of binding free energies difference($\Delta(\Delta G)$) of the enantiomers (R -(+) and S -(−) type) were consistent with the experimental separation factor(α). These suggest that the capability protein to identify different chiral compounds and the elution order of compounds (R -(+) and S -(−) type) could be reflected by molecular docking.

Keywords protein stationary phase, chiral separation, enantiomers, molecular docking