



微量热法在药物活性评价中的应用

胡艳军^{①②}, 蒋风雷^①, 欧阳宇^②, 刘义^{①*}

① 病毒学国家重点实验室; 生物医学分析化学教育部重点实验室; 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072

② 湖北师范学院化学与环境工程学院, 黄石 435002

*通讯作者, E-mail: prof.liuyi@263.net

收稿日期: 2010-04-27; 接受日期: 2010-05-08

摘要 围绕微量热法在药物研发、药物对微生物的抑制和抗菌药物筛选、中药基础理论, 以及药物与生物大分子相互作用等方面的研究工作, 初步总结了微量热方法在药物活性评价中的应用.

关键词

微量热法

药物

活性评价

生物大分子

焓-熵补偿效应

1 引言

药物是人类用来战胜疾病, 维持机体甚至社会健康发展的重要武器. 当前, 在药物活性评价和研发过程中, 热化学方法正发挥着其他方法不可替代的重要作用. 药物在机体内的作用与代谢, 实际上就是药物在机体内进行的一系列物理、生物、化学反应. 对有机体新陈代谢规律的研究, 是生命科学研究的重要内容之一. 有机体代谢过程中不可避免地会将部分能量以热的形式表现出来, 这就是代谢热. 微量热法可以直接测量这些过程中的热效应, 研究它们的速率和进行程度. 通过对药物的微量热分析, 可获得有关药物稳定性、结晶特性、溶解过程、浸润过程等方面的重要信息. 同时, 通过微量热技术, 可研究药物与生物大分子、细胞、组织的相互作用及其机理. 以这些信息为基础, 可以对药物的设计、生产、质量控制、存储和使用等环节进行指导和优化.

由于生物产热过程一般强度低、速率慢、周期长, 因此用一般的量热技术很难获得满意的结果. 新一代的微量热仪器(微量热法)灵敏度高, 能准确测定缓慢过程的热效应, 所以用于生物体系代谢过程的热量测定有许多独到之处: 它在测量中不用添加任

何试剂, 能直接监测生物体系所固有的代谢热过程, 不会引入干扰生物体系的正常活动和代谢的因素. 另外, 还可以有目的地加入有关物质, 以研究该物质对生物体代谢的影响. 它不需要制成透明清澈的溶液, 可直接测量离体的组织和悬浮液, 特别是在微量热实验之后, 对研究对象没有任何损坏, 样品还可以做进一步的分析测试研究. 尽管生物量热法缺乏特异性, 但研究对象本身有其固有的新陈代谢特异性, 所以用这种非特异性的方法可以得到特异性方法所得不到的结果, 有助于得到新的发现. 特别是随着人们对生命体系认识的不断深入, 高精度、微量化、自动化、商品化热量计的发展, 以及生物量热理论和技术日趋完善, 微量热方法不仅在生物化学^[1, 2]、环境科学^[3]、农业生态^[4]等方面获得了广泛的应用, 而且还可以提供药物的热力学参数, 成为了一种新的、具有广泛前景的药物活性评价工具^[5, 6].

本文将通过微量热法在药物研发中的应用, 微量热法研究药物对微生物的抑制和抗菌药物筛选, 微量热法在中药基础理论研究中的应用, 以及微量热法研究药物与生物大分子相互作用等方面的总结, 探讨微量热方法在药物活性评价中的应用.

2 微量热方法在药物研发中的应用

新药开发是一项耗时耗资的巨大工程. 其突出特点是“高技术、高投资、高风险、长周期”等. 从研究计划的启动, 到潜在药物的开发, 以及后期的临床试验, 一般需要 5 年. 在美国, 一个药物从发现到投入市场, 均需要经历临床前动物试验、三个时期的临床试验、两个阶段的食物和药品管理处的审批等程序. 2003 年的统计数据表明, 每开发一个新药的投资费用平均高达 8.97 亿美元, 并且耗资数目呈逐年上涨的趋势^[7]. 药物研发过程中的巨大投入意味着巨大的成本和风险. 早在二十世纪七、八十年代, 人们就尝试将微量热法运用到药物研究中^[8, 9]. 近年来, 随着生物量热的理论和技术的日趋完善, 微量热法在药物研究领域中的应用也越来越广泛. 其中包括药物稳定性研究^[10]、药物制剂研究^[11]、药物抗肿瘤或病毒活性研究、药物活性的定量构效关系(QSAR)^[12, 13]、抗菌药物活性筛选研究^[13-15]以及联合用药^[16, 17]等方面.

微量热法运用于抗菌药物的研究不但具有高灵敏度、高准确度、重复性好、操作方便等优点, 而且能够实现连续、实时、原位、定量的测量与分析, 从而获取丰富的热力学与热动力学信息、定量构效关系、甚至抗菌药物的作用机制等信息. 而且该方法对水溶性不好的样品同样适用, 这有利于将抗菌药物的筛选范围扩大, 大大提高了先导化合物发现的机会. 具体而言, 微量热法用作抗菌试验表现出了多方面的优势:

- (1) 适用性广, 甚至可用于非水溶性化合物或是易挥发性等特殊样品的抗菌活性的评价和筛选;
- (2) 通过对药物作用下的热谱图的分析, 结合热动力学模型, 可以得出药物的作用性质(如: 抑菌或杀菌), 并有助于药物作用机理的判断;
- (3) 可以方便结合基因工程技术, 更好地应用于药物筛选工作;
- (4) 有可能实现以非生长细菌为作用靶标的抗菌药物研究, 建立新的筛选方法和技术;
- (5) 对非水溶性化合物的抗菌活性实验, 可以更科学地进行溶剂的合理选择与使用;
- (6) 可以定量测定不同药物浓度作用下细菌被抑制的程度, 适用于对细菌具有不同抑制强度的药物的筛选;

(7) 可方便地进行联合用药的药效分析.

由此可见, 微量热法能够在很大程度上克服当前体外全细胞抗菌试验所存在的各种不足, 而且还可以实现以非生长细菌为靶标的抗菌活性研究新策略. 该方法有望在细菌耐药性不断威胁人类用药安全的今天, 为抗菌新药的研发起到积极的促进作用.

3 微量热法研究药物对微生物的抑制和抗菌药物筛选

用微量热方法对生物体系进行研究, 无论从热化学还是从生物学方面来看, 都是在经典领域的基础上向前跨进了一大步, 对促进学科之间的交叉渗透起着重要作用, 同时也提升了各传统学科自身的研究水平. 近年来, 武汉大学生物热化学实验室通过微量热方法对药物抑制模型生物生长代谢的研究, 取得了明显的成效^[18-21], 为筛选抗菌药物或抗菌先导化合物提供了大量基础数据.

3.1 细菌生长热谱图

微量热方法能用于药物与微生物方面的研究, 是因为细菌细胞内的各种代谢过程都伴有一定的热效应, 用微量热法连续测量细菌生长过程中的这种热效应变化, 即可获得细菌生长的“热谱图”.

细菌接种到培养基后以二分裂方式繁殖, 分裂后的子细胞也都具有活力. 在营养物质充足、保持整个培养液稳定的条件下, 以时间为横坐标, 细菌数为纵坐标, 根据不同培养时间里细菌数量的变化, 即可得出一条反映细菌在整个培养过程中数量变化规律的曲线. 假设一个细菌代谢产热功率为 W , 则 N 个细菌产热的功率 $P = N \cdot W$. 如果能测量出每个时刻的产热功率, 就能绘出细菌全过程的生长产热曲线(图 1).

如图 1 所示, 细菌生长产热曲线可分为四个时期, 即停滞期、指数生长期、稳定期和衰亡期. 一般的细菌生长产热曲线的四个时期等均十分完整, 并与培养过程的各个阶段能很好地吻合. 在相同的实验条件下, 其生长曲线具有良好的重现性, 可利用它作为“指纹图谱”对细菌进行鉴别. 微量热法可用鉴别细菌的变异株, 还可用来研究细菌的生长及其返祖现象. 细菌生长曲线中包含着丰富的热力学和动力学信息, 已引起了微生物学、医学和热化学工作者的高度重视^[22-24].

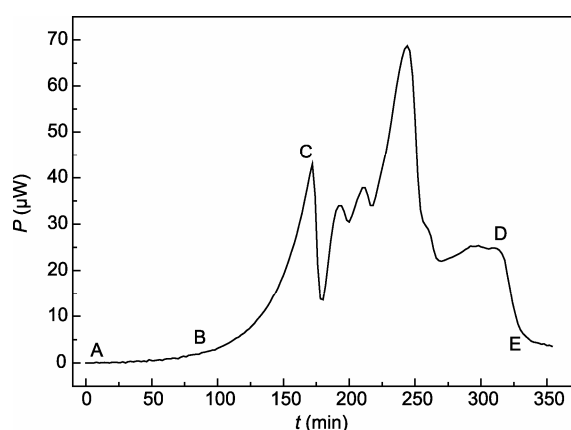


图1 大肠杆菌的生长产热曲线

3.2 细菌生长热谱曲线热动力学信息

细菌生长过程的热谱曲线,包含着有关细菌生长代谢过程的丰富信息.例如:对热谱曲线的指数生长期进行解析,建立相关生长热动力学模型,可得出细菌生长的速率常数、激活能和有关热力学参数等^[18].

在细菌的指数生长期,细菌数量呈指数式增加.如果在初始时刻($t=0$)细菌的数目为 N_0 , t 时刻细菌的数目为 N_t , 则

$$N_t = N_0 \exp(kt) \quad (1)$$

k 是生长速率常数.如果每个细菌的热输出为 W , 那么

$$N_t W = N_0 W \exp(kt) \quad (2)$$

若 P 为产热功率,由 $P_0 = N_0 W$ 且 $P_t = N_t W$ 即可得出:

$$P_t = P_0 \exp(kt)$$

或 $\ln P_t = \ln P_0 + kt \quad (3)$

从生长产热曲线的指数生长期取一系列的 $P_t \sim t$ 数据,按(3)式,以 $\ln P_t$ 对 t 进行线性拟合,即可求出 k 值,即细菌生长的速率常数.

通过测量细菌在不同温度下的生长热谱图,用上述方法得到不同温度下细菌生长的速度常数 k_T ,实验结果表明 k_T 和 T 的关系符合 Arrhenius 方程,即

$$k_T = A e^{-E_a/RT}$$

或 $\ln k_T = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (4)$

由(4)式,以 $\ln k_T$ 对 $1/T$ 进行线性拟合,即可求出细菌的生长激活能 E_a .

3.3 不同药物对微生物生长繁殖的抑制

目前评价药物抑菌活性的两种常规方法—管碟法和比浊法,虽然可以有效地反映药物抑菌活性的强弱,但难以表征微生物受药物干预过程中的特征信息,即无法获得实时在线的动态数据.微量热法作为一种非侵入、非破坏性的技术,能够连续、实时、原位、定量地测量和分析研究体系的热变化.微量热法研究抗菌素对微生物的抑制作用,具有重要的医学临床应用和理论价值.例如: Mard 等^[25]研究了不同的 β -内酰胺组抗菌素(青霉素 G、氨比西林、羟胺青霉素和二氯西林)对金黄色葡萄球菌产热的影响; Beezer 等^[26]研究了间位烷基取代的苯酚盐与 *E. coli* 和金黄色葡萄球菌的作用情况,发现生物响应与这类药物烷基链上所具有的亚甲基数目之间存在着线性关系,其相互作用有 collander 型关系存在; Krüger 等^[27]研究了氯霉素对金黄色葡萄球菌属的抑制作用程度、效果; Hartung^[28]研究了青霉素 G、氧四环素、多黏菌素 B 对 *E. coli* 的影响.我们实验室^[6, 18]研究了十余种西药药物对金黄色葡萄球菌、产气杆菌和 *E. coli* 生长的影响,并得到了一系列有意义的结果.微量热法用于药物抗菌活性检测,寻求抗菌素结合使用的最大效率、探索适当比例,探讨药物的构效关系,指导药物合成等研究都是十分有前途的工具.与传统的方法相比较,微量热法在研究中药的抗菌活性方面有着独特的优势,且能较好地反映中医药整体观、平衡观、动态观和整合调节作用.

4 微量热法在中药基础理论研究中的应用

中药是中华民族瑰宝,在我国具有悠久的历史,是祖国医学中的一颗璀璨的明珠,在过去几千年的历史实践中,形成了完整、独特、系统的理论和诊疗方法,为中华民族的健康、繁衍和发展做出不可磨灭的贡献,同时也为世界医药的发展做出了巨大的贡献.但是,近年来质疑中药的有效性和安全性的声音越来越多,其主要原因之一便是中药治疗疾病的作用机理不够明确,中药理论和临床研究方法中许多合理的、科学的内涵没有得到充分的揭示.因此,中药的发展急需引进现代科学和技术,迫切需要与现代科学技术的理论和方法相结合,最终实现中药的现代化.

中药学与热力学有许多相通的地方,如两者都重在研究系统的存在状态(始态和终态)和变化方向,而可以忽略系统的内部构成和变化过程;两者都讲求系统平衡与调节,开放条件下的生命体系和化学体系都属于耗散结构,众多的生理病理现象和物理化学现象都可以用耗散结构理论加以阐释.从某种意义上讲,生命体系就是一个开放的热力学系统,生命活动规律也符合热力学定律.中药的药性功能,即药物的生物活性,在一定程度上也是机体对物理热变化的一种生理或病理感受^[29].

中国人民解放军第302医院全军中药研究所肖小河研究员等将微量热方法引入中药药理研究,取得了系列研究成果^[30-33].研究显示,通常情况下,温热药作用于机体一般表现为功能的亢奋,机体功能亢奋则需要消耗较多的能量,就会产生较多的热量;反之,寒凉药作用于机体一般表现为功能的抑制,机体功能抑制,则消耗能量较少或抑制产热.从另一层面上说,这种由中药药性功能导致的机体对物理热变化的感受,从本质上讲就是中药与生物机体之间的相互作用,这种相互作用是一系列物理、化学和生理反应.而任何反应发生时,均伴随有能量的转移和变化,这些能量的转移和热变化,均可通过热力学方法加以检测和表达.无论是阴阳五行学说、天人合一整体观、平衡观、辨证施治等中医药基本理论,还是“寒者热之,热者寒之”、“实者虚之,虚者补之”等中医治则治法,均蕴涵了丰富而复杂的能量-物质-信息的代谢或转换关系,均体现了热力学基本理论.

作为能量转移和热效应检测的重要研究手段,热力学方法以体系的状态参数为研究对象,能够合理反映生命体系中的能量代谢和变化规律,科学客观地揭示(诊断)身体状态及变化规律,符合中药学的整体观、系统观、动态观和平衡观,已发展成为研究中药的重要方法之一.

5 微量热法研究药物与生物大分子相互作用

5.1 药物小分子与生物大分子的相互作用

伴随生命体代谢过程有两类重要的生物大分子:(1)功能分子蛋白质(包括酶);(2)信息分子DNA和RNA.蛋白质和核酸等生物大分子具有较复杂的高级结构,它们的功能与结构有密切的关系.而现代药

物设计的主要任务之一便是寻找能和靶点分子有较强的、特异性的亲合作用的药物分子.能够表征分子间相互作用的方法有很多种,例如:核磁共振、分子荧光、表面等离子体共振(SPR)、圆二色谱(CD)等,但是这些方法均不能直接获得相互作用的热力学参数.量热法在研究药物与大分子相互作用上有其特有的优势,它适用的体系广泛,直接以热量作为探测信号,因而可以直接获得热力学参数.如果将获得的热力学参数(焓、熵和结合常数等)和药物的结构信息结合起来,找出其中的规律,建立起模型系统,则可以指导药物分子设计.

随着量热仪器的精密度不断提高,对于一些热效应极小的过程作出精确的测量已不难实现.在药物与生物大分子相互作用的研究方面,以LKB2277量热仪(瑞典产,微瓦级)用作研究手段已有报道^[34, 35],随着TAM-III(瑞典产,纳瓦级)微量热仪,尤其是纳瓦级等温微量热仪(nano isothermal titration calorimeter, nano-ITC)的问世,量热方法在该领域的研究更加活跃^[36, 37],它不仅能够直接测定药物小分子与生物大分子作用过程的热效应,而且能通过拟合滴定曲线,同时获取结合焓变 ΔH 、结合常数(K_a)和结合位点数(n)等,通过这些数据可进一步计算反应的自由能和熵变化.

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (5)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (6)$$

并且通过测定不同温度下的反应焓变 ΔH ,可以得到恒压热容:

$$\Delta C_p = \frac{\Delta H_{T_1} - \Delta H_{T_2}}{T_2 - T_1} \quad (7)$$

此外,等温热量计还可以研究各种因素对反应热力学参数的影响,进而研究热力学参数与大分子构象变化之间的关系.

目前,在药物分子与生物大分子相互作用的研究中,应用得最多的量热方法是等温微量热法(ITC).Murphy等人^[38]用ITC法研究了一种多肽荷尔蒙与它的蛋白质受体分子之间结构的识别问题,通过测定不同温度下的结合反应,获得了其热力学函数值,结果显示热容和焓变值直接与溶剂和极性或非极性表面接触后的变化相关,熵变则是溶剂接触依赖函数和统计函数的综合.Aki等人^[39]用量热法

研究了一系列药物与人血清白蛋白(HSA)的反应, 他们建立了多级反应模型, 获得的热力学参数对了解反应模式和分子识别有重要作用. Banerjee 等人^[40]用 ITC 和光谱方法研究了两种药物萘普生(naproxen)和阿米替林(amitriptyline)与牛血清白蛋白(BSA)之间的结合, 获得了它们之间结合的热力学信息并讨论了它们的结合模式.

关于药物与 DNA 的相互作用的研究, 一直是一个比较活跃的领域, 因为许多药物治疗疾病, 是通过进入到人体细胞, 在 DNA 双螺旋里与碱基对发生嵌插作用来实现的. Nguyen 等人^[41]用 ITC 和光谱法、SPR 等方法研究了抗锥虫药 CGP 40215A 和 DNA 的相互作用, 从获得的焓和热容等信息可以判断质子在它们结合过程中的连接作用. White 等人^[42]研究了有机阳离子对四链 DNA 的识别, ITC 实验结果表明其结合过程是由焓驱动的.

可以预料, 今后相当长一个时期, 热化学方法, 尤其是精密微量热技术在药物设计和研发方面, 将扮演越来越重要的角色.

5.2 药物小分子与生物大分子作用的焓-熵补偿效应

除了热化学方法直接检测药物小分子与生物大分子非特异性相互作用的热力学参数外, 通过其他方法也能间接推导和得到相互作用的相关参数. 例如通过光谱学的方法, 可以得到相关结合参数, 进而推导出药物小分子与生物大分子作用的焓变、熵变等热力学参数, 并分析相互作用过程的主要驱动力.

Scatchard^[43]将小分子配体与大分子结合看作是分子间特定部位的结合, 在此基础上推导了溶液中生物大分子与有机小分子结合反应的经典理论公式, 即 Scatchard 方程:

$$\frac{r}{C_f} = nK - rK \quad (8)$$

式中 r 是每摩尔蛋白结合的药物的物质的量; C_f 是游离药物浓度; K 与 n 分别是结合常数与结合位点数. 利用 Scatchard 方程, 以 r/C_f 对 r 作图, 可以求得蛋白质与药物小分子的结合常数 K 以及结合位点数 n . 若反应存在多种结合位点, 则上式变为:

$$r = \sum n_i K_i C_f / (1 + K_i C_f) \quad (9)$$

式中 K_i 、 n_i 分别表示第 i 位的结合常数和结合位点数, 可通过非线性拟合求得.

通过荧光猝灭实验, 假设生物大分子的若干个结合位点是独立且相同的, 若以 F_0 、 F 分别表示没有药物小分子(猝灭剂)和有药物小分子存在时实验体系的荧光强度, 则^[44]:

$$\lg \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \lg K_b + n \lg [Q] \quad (10)$$

通过式(10), 药物小分子与生物大分子之间反应的结合常数 K_b 和结合位点数 n 便可计算出来.

当然, 也有其他一些求算结合常数和结合位点数的方法, 诸如 Lineweaver-Burk 双倒数方程^[45], Sips 作图法^[46]等等.

根据相互作用的热力学参数, 可以近似判断活性小分子与生物大分子之间的主要作用力类型^[47, 48]. 若在研究的温度范围内, 反应的焓变没有明显变化, 视为常数, 利用 van't Hoff 方程可以计算反应的焓变 ΔH 和熵变 ΔS 以及通过式(5)计算不同温度下反应的自由能变 ΔG ^[49].

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (11)$$

文献报道的大量不同类型的药物小分子与生物大分子相互作用的热力学参数表明, 小分子与生物大分子作用过程的焓变与熵变之间存在着某种明确的关系, 即焓-熵补偿效应. 结合我们课题组前期工作^[50-65]和国内外研究人员近期研究结果^[66-94], 以 $\Delta H(\text{kJ mol}^{-1})$ 对 $\Delta S(\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1})$ 作图, 得焓-熵关系图(图 2).

将图 2 中各点线性拟合, 得:

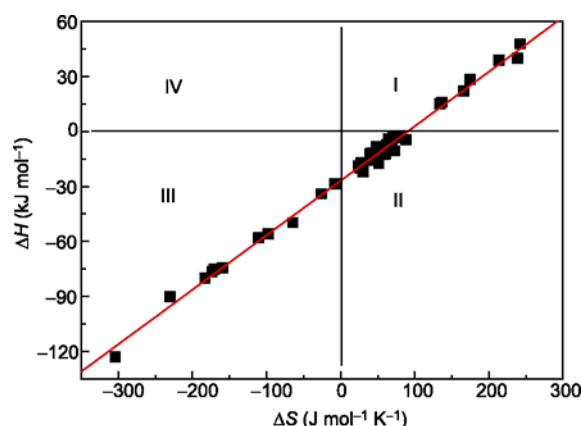


图 2 药物小分子与血清白蛋白作用的焓-熵关系图

$$\Delta H(\text{kJ mol}^{-1}) = -26.895 + 0.297\Delta S(\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1})$$

图 2 表明: 药物小分子与蛋白质等生物大分子作用过程的焓变与熵变间存在明确的线性关系(线性相关系数 $R = 0.9969$).

将图 2 按照药物与生物大分子作用的驱动力类型划分为 I~IV 四个区域, 则 I 区为熵驱动; II 区为焓、熵协同驱动; III 区为焓驱动; 而 IV 区则是焓和熵都不利于结合的非自发过程.

由此可见: 药物小分子和生物大分子相互作用的焓-熵补偿效应能帮助人们了解它们的结合方式, 能够指导研究者更加理性地设计活性药物分子, 而不是盲目地筛选.

6 结语

生物热化学是一门新兴的前沿交叉学科, 它与生物学、物理学、环境科学、药理学等相互交叉. 近年来, 随着量热仪器精度的提高, 量热技术与生物学

相结合而兴起的生物微量热技术, 致力于通过对微生物、细胞器、细胞、生物大分子、新陈代谢以及生物系统中其他生物分子的研究, 来了解生物体功能的分子机制, 在生物制药、药理研究、药物活性评价、药物筛选与研发等方面取得了丰硕的成果. 随着科学技术的发展, 微量热技术将在未来的生命科学研究中发挥更大的作用.

当然, 每一种方法都有其局限性, 微量热法也不例外. 微量热方法只能得到研究体系的宏观性质, 而不能获取分子水平的微观信息; 微量热方法也不能完全取代药物研发中的动物实验. 要更全面、更深入地理解和认识事物的本质, 就必须将微量热法与其他技术方法相结合. 可以看到, 越来越多的研究工作同时应用量热技术和其他多种技术手段, 诸如光谱技术、波谱技术、结构分析手段、显微技术以及一些先进的联用技术等等. 我们相信, 随着微量热技术以及其他技术的不断进步, 将极大地促进生命科学的发展.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20803019, 20873096 & 20921062)和湖北省教育厅科学技术研究计划(Q20082205)资助, 特此致谢.

参考文献

- Owusu RK, Trehwella MJ, Finch A. Flow microcalorimetric study of immobilized enzyme kinetics using the urea-immobilized urease system. *Biochem Biophys Acta*, 1985, 830: 282—287
- Ripa KT, Mårdh PA, Hovelius B, Ljungholm K. Microcalorimetry as a tool for evaluation of blood culture media. *J Clin Microbiol*, 1977, 5: 393—396
- Yan CN, Liu Y, Wang TZ, Tan ZQ, Qu SS, Shen P. Thermochemical studies of the toxic actions of heavy metal ions on *Rhizopus nigricans*. *Chemosphere*, 1999, 38: 891—898
- Kawabata T, Yamano H, Takahashi K. An attempt to characterize calorimetrically the inhibitory effect of foreign substances on microbial degradation of glucose in soil. *Agric Biol Chem*, 1983, 47: 1281—1288
- Li MY, Hu PZ, Zhu JC, Liu Y, Xu KX. Synthesis, spectrum, crystal structure and antibacterial activities of new polydentate schiff base ligands containing a pyridine ring and amide moieties. *Chin J Chem*, 2005, 23: 437—442
- 朱军成. 新型席夫碱抗菌化合物研究及微量热法的运用. 武汉大学博士学位论文. 2006
- 郭年新. 药类新活性物质的开发时间约 5.5 年到 23 年. *精细与专用化学品*, 2003, 18: 27—28
- Beezer AE, Chowdhry BZ, Newell RD, Tyrrell HJ. Bioassay of antifungal antibiotics by flow microcalorimetry. *Anal Chem*, 1977, 49: 1781—1784
- Beezer AE, Miles RJ, Shaw EJ, Vickerstaff L. Antibiotic bioassay by flow microcalorimetry. *Cell Mol Life Sci*, 1980, 36: 1051—1052
- Buckton G, Beezer AE. The applications of microcalorimetry in the field of physical pharmacy. *Int J Pharm*, 1991, 72: 181—191
- Beezer AE, Mitchell JC, Colegate RM, Scally DJ, Twyman LJ, Willson RJ. Microcalorimetry in the screening of discovery compounds and in the investigation of novel drug delivery systems. *Thermochim Acta*, 1995, 250: 277—283
- Montanari MLC, Andricopulo AD, Montanari CA. Calorimetry and structure-activity relationships for a series of antimicrobial hydrazides. *Thermochim Acta*, 2004, 417: 283—294
- Montanari MLC, Beezer AE, Montanari CA, Piló-Veloso D. QSAR based on biological microcalorimetry. *J Med Chem*, 2000, 43:

- 3448—3452
- 14 O'Neill MAA, Vine GJ, Beezer AE, Bishop AH, Hadgraft J, Labetoulle C, Walker M, Bowler PG. Antimicrobial properties of silver-containing wound dressings: a microcalorimetric study. *Int J Pharm*, 2003, 263: 61—68
 - 15 Garedeew A, Schmolz E, Lamprecht I. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an *in vitro* approach. *Thermochim Acta*, 2004, 422: 115—124
 - 16 Kjeldsen NJ, Beezer AE, Miles RJ. Flow microcalorimetric assay of antibiotics—III. Zinc bacitracin and its combinations with polymyxin B sulphate and neomycin sulphate on interaction with *Micrococcus luteus*. *J Pharm Biomed Anal*, 1989, 7: 865—869
 - 17 Kjeldsen NJ, Beezer AE, Miles RJ, H. Sodha. Flow microcalorimetric assay of antibiotics—IV. Polymyxin B sulphate, neomycin sulphate, zinc bacitracin and their combinations with *Escherichia coli* suspended in buffer plus glucose medium. *J Pharm Biomed Anal*, 1989, 7: 871—875
 - 18 刘义. 细菌和线粒体代谢特征热化学研究. 武汉大学博士学位论文, 1997
 - 19 Zhu JC, Aazaz A, Liu Y, Shen P, Yang Y, Qu SS. Measuring the relative promoter activity in *Escherichia coli* by a calorimetric method. *Thermochim Acta*, 2005, 439: 52—57
 - 20 Liu GS, Liu Y, Chen XD, Liu P, Shen P, Qu SS. Studies on interaction between T4 phage and *Escherichia coli* B by microcalorimetry. *J Virol Methods*, 2003, 112: 137—143
 - 21 Hou AX, Xue Z, Liu Y, Qu SS, Wong WK. Antibacterial effects of a monophorphyrinato Ytterbium(III) complex and its free components on *Staphylococcus aureus* as determined by stop-flow microcalorimetry. *Chem Biodivers*, 2007, 4: 1492—1500
 - 22 Li YS, Zhang Y, Chen ZZ, Zhang AQ, Tang HW, Jiang FL, Liu Y. Microcalorimetric and microscopic studies on the inhibitory activities of methylene blue/TiO₂ nanocomposites on *Staphylococcus aureus* and the mechanism of cell damage. *Thermochim Acta*, 2010, 501: 8—12
 - 23 Kong WJ, Zhao YL, Xiao XH, Wang JB, Li HB, Li ZL, Jin C, Liu Y. Spectrum-effect relationships between ultra performance liquid chromatography fingerprints and anti-bacterial activities of *Rhizoma coptidis*. *Anal Chim Acta*, 2009, 634: 279—285
 - 24 Chen HL, Yao J, Wang L, Wang F, Bramanti E, Maskow T, Zaray G. Evaluation of solvent tolerance of microorganisms by microcalorimetry. *Chemosphere*, 2009, 74: 1407—1411
 - 25 Mard PA. New applications of calorimetry in clinical bacteriology. In: Johnston HH, Newsom SWB, Eds. *2nd International Symposium on Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Oxford: Learned Information (Europe) Ltd. 1976
 - 26 Beezer AE, Fox GG, Gooch CA, Hunter WH, Miles RJ, Smith BV. Microcalorimetric studies of the interaction of m-hydroxybenzoates with *E. coli* and with *S. aureus*. Demonstration of a Collander relationship for biological response. *Int J Pharm*, 1988, 45: 153—155
 - 27 Krüger D, Giesbrecht P. Flow microcalorimetry as a tool for an improved analysis of antibiotic activity: The different stages of chloramphenicol action. *Cell Mol Life Sci*, 1989, 45: 322—325
 - 28 Hartung J. Estimating the biological effect of detrimental substances on *E. coli* with flow microcalorimetry. II. Studies using 3 antibiotics. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg B*, 1986, 183: 47—57
 - 29 肖小河, 王永炎. 从热力学角度审视和研究中医药. 北京: 2003 年中华中医药科技成果论坛大会专题报告. 2004, (2): 74—79
 - 30 鄢丹, 肖小河, 金城, 董小萍. 微量热法研究黄连中小檗碱类生物碱对金黄色葡萄球菌生长代谢的影响. 中国科学 B: 化学, 2008, 38: 487—491
 - 31 孔维军, 赵艳玲, 山丽梅, 肖小河, 郭伟英. 基于微量热法的板蓝根提取方法和活性部位挑选. 化学学报, 2008, 66: 1111—1116
 - 32 武彦舒, 张倩, 金城, 鄢丹, 刘义, 肖小河, 杜晓曦, 王建. 清开灵注射液生物热活性指纹图谱的初步研究. 中国药学杂志, 2009, 44: 471—474
 - 33 周丹蕾, 鄢丹, 李宝才, 武彦舒, 肖小河. 微量热法研究天然虫草和人工虫草对大肠杆菌生长代谢的影响. 药化学报, 2009, 44: 640—644
 - 34 Tan F, Guo M, Yu Q. Studies on interaction between gatifloxacin and human serum albumin as well as effect of copper(II) on the reaction. *Spectrochim Acta Pt A*, 2005, 61: 3006—3012
 - 35 Qu SS, Liu Y, Wang TZ, Gao WY. Thermodynamics of binding of cadmium to bovine serum albumin. *Chemosphere*, 2002, 46: 1211—1214
 - 36 Nielsen PK, Bønsager BC, Berland CR, Sigurskjöld BW, Svensson B. Kinetics and energetics of the binding between barley α -amylase/subtilisin inhibitor and barley α -amylase 2 analyzed by surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Biochemistry*, 2003, 42: 1478—1487
 - 37 Sawas AH, Pentyla SN, Rebecchi MJ. Binding of volatile anesthetics to serum albumin: Measurements of enthalpy and solvent contributions. *Biochemistry*, 2004, 43: 12675—12685
 - 38 Murphy KP, Xie D, Garcia KC, Amzel LM, Freire E. Structural energetics of peptide recognition: angiotensin II/antibody binding. *Proteins*:

Struct Funct Genet, 1993, 15: 113—120

- 39 Aki H, Goto M, Yamamoto M. Thermodynamic aspects of the molecular recognition of drugs by human serum albumin. *Thermochim Acta*, 1995, 251: 379—388
- 40 Banerjee T, Singh SK, Kishore N. Binding of naproxen and amitriptyline to bovine serum albumin: Biophysical aspects. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 24147—24156
- 41 Nguyen B, Stanek J, Wilson WD. Binding-linked protonation of a DNA minor-groove agent. *Biophys J*, 2006, 90: 1319—1328
- 42 White EW, Tanious F, Ismail MA, Reszka AP, Neidle S, Boykin DW, Wilson WD. Structure-specific recognition of quadruplex DNA by organic cations: Influence of shape, substituents and charge. *Biophys Chem*, 2007, 126: 140—153
- 43 Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci*, 1949, 51: 660—672
- 44 Kang J, Liu Y, Xie MX, Li S, Jiang M, Wang YD. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1674: 205—214
- 45 马贵斌, 高飞, 任斌知, 杨频. 荧光法研究药物分子与人血清白蛋白的结合作用. *化学学报*, 1995, 53: 1193—1197
- 46 Rabbany SY, Piervincenzi R, Judd L, Kusterbeck AW, Bredehorst R, Hakansson K, Ligler FS. Assessment of heterogeneity in antibody-antigen displacement reactions. *Anal Chem*, 1997, 69: 175—182
- 47 Leckband D. Measuring the forces that control protein interactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29: 1—26
- 48 Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096—3102
- 49 Haynie DT. *Biological Thermodynamics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. 73—117
- 50 Hu YJ, Ou-Yang Y, Dai CM, Liu Y, Xiao XH. Site-selective binding of human serum albumin by palmitate: Spectroscopic approach. *Biomacromolecules*, 2010, 11: 106—112
- 51 Hu YJ, Liu Y, Zhao RM, Qu SS. Interaction of colchicine with human serum albumin investigated by spectroscopic methods. *Int J Biol Macromol*, 2005, 37: 122—126
- 52 Hu YJ, Liu Y, Xiao XH. Investigation of the interaction between berberine and human serum albumin. *Biomacromolecules*, 2009, 10: 517—521
- 53 Hu YJ, Ou-Yang Y, Bai AM, Li W, Liu Y. Investigation of the interaction between ofloxacin and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. *J Solution Chem*, 2010, 39: 709—717
- 54 Hu YJ, Liu Y, Zhang LX, Zhao RM, Qu SS. Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method. *J Mol Struct*, 2005, 750: 174—178
- 55 Hu YJ, Liu Y, Sun TQ, Bai AM, Lü JQ, Pi ZB. Binding of anti-inflammatory drug cromolyn sodium to bovine serum albumin. *Int J Biol Macromol*, 2006, 39: 280—285
- 56 Hu YJ, Liu Y, Pi ZB, Qu SS. Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 6609—6614
- 57 Hu YJ, Liu Y, Wang JB, Xiao XH, Qu SS. Study of the interaction between monoammonium glycyrrhizinate and bovine serum albumin. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36: 915—919
- 58 Hu YJ, Yu HG, Dong JX, Yang X, Liu Y. Spectroscopic studies on the interaction between 3,4,5-trimethoxybenzoic acid and bovine serum albumin. *Spectrosc Acta Pt A*, 2006, 65: 988—992
- 59 Hu YJ, Li W, Liu Y, Dong JX, Qu SS. Fluorometric investigation of the interaction between methylene blue and human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39: 740—745
- 60 Hu YJ, Wang Y, Ou-Yang Y, Zhou J, Liu Y. Characterize the interaction between naringenin and bovine serum albumin using spectroscopic approach. *J Lumin*, 2010, 130: 1394—1399
- 61 Hu YJ, Ou-Yang Y, Dai CM, Liu Y, Xiao XH. Binding of berberine to bovine serum albumin: Spectroscopic approach. *Mol Biol Rep*, 2010, doi: 10.1007/s11033-010-0038-x
- 62 Zhang YZ, Xiang X, Mei P, Dai J, Zhang LL, Liu Y. Spectroscopic studies on the interaction of Congo Red with bovine serum albumin. *Spectrosc Acta Pt A*, 2009, 72: 907—914
- 63 Zhang YZ, Dai J, Xiang X, Li WW, Liu Y. Studies on the interaction between benzidine and bovine serum albumin by spectroscopic methods. *Mol Biol Rep*, 2010, 37: 1541—1549
- 64 Zhang YZ, Dai J, Zhang XP, Yang X, Liu Y. Studies of the interaction between Sudan I and bovine serum albumin by spectroscopic methods. *J Mol Struct*, 2008, 888: 152—159
- 65 Cheng XX, Lui Y, Zhou B, Xiao XH, Liu Y. Probing the binding sites and the effect of berbamine on the structure of bovine serum albumin.

- Spectroc Acta Pt A*, 2009, 72: 922—928
- 66 Naik PN, Chimatadar SA, Nandibewoor ST. Study on the interaction between antibacterial drug and bovine serum albumin: A spectroscopic approach. *Spectroc Acta Pt A*, 2009, 73: 841—845
- 67 Li J, Liu X, Ren C, Li J, Sheng F, Hu Z. *In vitro* study on the interaction between thiophanate methyl and human serum albumin. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 2009, 94: 158—163
- 68 Cui F, Zhang Q, Yao X, Luo H, Yang Y, Qin L, Qu G, Lu Y. The investigation of the interaction between 5-Iodouracil and human serum albumin by spectroscopic and modeling methods and determination of protein by synchronous fluorescence technique. *Pestic Biochem Phys*, 2008, 90: 126—134
- 69 Cui F, Yan Y, Zhang Q, Du J, Yao X, Qu G, Lu Y. Characterization of the interaction between 2'-deoxyuridine and human serum albumin. *Carbohydr Res*, 2009, 344: 642—647
- 70 Cui F, Qin L, Zhang G, Liu X, Yao X, Lei B. A concise approach to 1,11-didechloro-6-methyl-4'-O-demethyl rebeccamycin and its binding to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy and molecular modeling method. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 7615—7621
- 71 Cui F, Qin L, Zhang G, Liu Q, Yao X, Lei B. Interaction of anthracycline disaccharide with human serum albumin: Investigation by fluorescence spectroscopic technique and modeling studies. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48: 1029—1036
- 72 Cui F, Kong X, Qin L, Zhang G, Liu Q, Lei B, Yao X. Specific interaction of 4'-O-(α -l-Cladinosyl) daunorubicin with human serum albumin: The binding site II on HSA molecular using spectroscopy and modeling. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 2009, 95: 162—169
- 73 Tian J, Liu J, He W, Hu Z, Yao X, Chen X. Probing the binding of scutellarin to human serum albumin by circular dichroism, fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling method. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 1956—1961
- 74 Li Y, Yao X, Jin J, Chen X, Hu Z. Interaction of rhein with human serum albumin investigation by optical spectroscopic technique and modeling studies. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1774: 51—58
- 75 Liu J, Tian J, Hu Z, Chen X. Binding of isofraxidin to bovine serum albumin. *Biopolymers*, 2004, 73: 443—450
- 76 Li Y, He W, Tian J, Tang J, Hu Z, Chen X. The effect of Berberine on the secondary structure of human serum albumin. *J Mol Struct*, 2005, 743: 79—84
- 77 Tian J, Liu J, Hu Z, Chen X. Interaction of wogonin with bovine serum albumin. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 4124—4129
- 78 Yue Y, Chen X, Qin J, Yao X. A study of the binding of C.I. Direct Yellow 9 to human serum albumin using optical spectroscopy and molecular modeling. *Dyes Pigments*, 2008, 79: 176—182
- 79 Zhang HM, Chen TT, Zhou QH, Wang YQ. Binding of caffeine, theophylline, and theobromine with human serum albumin: A spectroscopic study. *J Mol Struct*, 2009, 938: 221—228
- 80 Wang N, Ye L, Yan F, Xu R. Spectroscopic studies on the interaction of azelnidipine with bovine serum albumin. *Int J Pharm*, 2008, 351: 55—60
- 81 Zhang Y, Yue Y, Li J, Chen X. Studies on the interaction of caffeic acid with human serum albumin in membrane mimetic environments. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 2008, 90: 141—151
- 82 He WY, Chen HJ, Sheng FL, Yao XJ. Molecular modeling and spectroscopic studies on binding of 2,6-bis[4-(4-amino-2-trifluoromethylphenoxy)benzoyl] pyridine to human serum albumin. *Spectroc Acta Pt A*, 2009, 74: 427—433
- 83 Wang YQ, Tang BP, Zhang HM, Zhou QH, Zhang GC. Studies on the interaction between imidacloprid and human serum albumin: Spectroscopic approach. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 2009, 94: 183—190
- 84 Ding F, Li N, Han B, Liu F, Zhang L, Sun Y. The binding of C.I. Acid Red 2 to human serum albumin: Determination of binding mechanism and binding site using fluorescence spectroscopy. *Dyes Pigments*, 2009, 83: 249—257
- 85 Zhang G, Zhao N, Hu X, Tian J. Interaction of alpinetin with bovine serum albumin: probing of the mechanism and binding site by spectroscopic methods. *Spectroc Acta Pt A*, 2010, 76: 410—417
- 86 Katrahalli U, Jaldappagari S, Kalanur SS. Study of the interaction between fluoxetine hydrochloride and bovine serum albumin in the imitated physiological conditions by multi-spectroscopic methods. *J Lumin*, 2010, 130: 211—216
- 87 Hao SZ, Liu SD, Wang XH, Cui XJ, Guo LP. Study of the interaction of $\text{Na}_9[\text{SbW}_9\text{O}_{33}] \cdot 19.5\text{H}_2\text{O}$ with bovine serum albumin: Spectroscopic and voltammetric methods. *J Lumin*, 2009, 129: 1320—1325
- 88 Song SM, Hou XL, Wu YB, Shuang SM, Yang C, Inoue Y, Dong C. Study on the interaction between methyl blue and human serum albumin by fluorescence spectrometry. *J Lumin*, 2009, 129: 169—175
- 89 Ding F, Zhao G, Chen S, Liu F, Sun Y, Zhang L. Chloramphenicol binding to human serum albumin: Determination of binding constants and binding sites by steady-state fluorescence. *J Mol Struct*, 2009, 929: 159—166
- 90 Guo X, Han X, Tong J, Guo C, Yang W, Zhu J, Fu B. The investigation of the interaction between piracetam and bovine serum albumin by

spectroscopic methods. *J Mol Struct*, 2010, 966: 129—135

- 91 Ding F, Pan H, Li ZY, Liu F, Sun Y. Spectroscopic studies on the binding of barbitol to bovine serum albumin. *J Lumin*, 2009, 129: 650—655
- 92 Pan X, Liu R, Qin P, Wang L, Zhao X. Spectroscopic studies on the interaction of acid yellow with bovine serum albumin. *J Lumin*, 2010, 130: 611—617
- 93 Sun W, Du Y, Chen J, Kou J, Yu B. Interaction between titanium dioxide nanoparticles and human serum albumin revealed by fluorescence spectroscopy in the absence of photoactivation. *J Lumin*, 2009, 129: 778—783
- 94 Sen P, Fatima S, Ahmad B, Khan RH. Interactions of thioflavin T with serum albumins: Spectroscopic analyses. *Spectrosc Acta Pt A*, 2009, 74: 94—99

Microcalorimetry in drug activity evaluation

HU YanJun^{1,2}, JIANG FengLei¹, OUYANG Yu² & LIU Yi¹

- 1 State Key laboratory of Virology; Key Laboratory of Analytical Chemistry for Biology and Medicine (Ministry of Education); College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China
- 2 College of Chemistry and Environmental Engineering, Hubei Normal University, Huangshi 435002, China

Abstract: Microcalorimetry has been found wide applications in drug activity evaluation in the last few years, particularly when drug discovery, microorganism inhibition and antimicrobial drugs screening, basic theory of traditional Chinese medicine, and drug interactions with biomacromolecules are under consideration. Recent progress in these fields is preliminarily reviewed.

Keywords: microcalorimetry, drug, activity evaluation, biomacromolecule, enthalpy-entropy compensation effect