

建立高效液相色谱-串联质谱检测 细胞内腺苷酸浓度的方法及其应用*

李 宁¹⁾ 张海涛²⁾ 罗 辉^{1)**} 张良滔³⁾ 熊 勇¹⁾ 贾振斌¹⁾

(¹⁾ 广东医学院化学教研室, 湛江 524023; ²⁾ 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023;

³⁾ 广东医学院分析中心, 湛江 524023)

摘要 细胞内腺苷酸浓度变化是细胞能量代谢改变的感应器, 建立高效液相色谱-串联质谱法检测细胞内腺苷酸浓度的方法有助于监测药物对细胞能量代谢的影响. 用含有 Na-EDTA 的高氯酸溶液超声裂解细胞. 采用超高效 HSS T3 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 以 8 mmol/L N, N-二甲基己胺(DMHA)水溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 采用正离子模式质谱检测, 在多反应监测(MRM)模式下进行定性定量分析. 结果表明, AMP、ADP 和 ATP 分别在(0.1814~14.5164) μmol/L、(0.2342~18.7354) μmol/L 和(0.2003~16.0260) μmol/L 线性范围内具有良好的线性关系, 其相关系数分别为 0.9984、0.9964 和 0.9990. AMP、ADP 和 ATP 的检出限(LOD, S/N>3)分别为 1.9291、1.8794 和 166.5 nmol/L, 定量限(LOQ, S/N>10)为 1.9632、1.9672 和 185.6 nmol/L, 且加标回收率为 81.8%~107.8%, 相对标准偏差小于 7.55%. AMP、ADP 和 ATP 的日内偏差(RSD)分别为 6.16%、5.13%和 7.66%, 日间偏差(RSD)分别为 6.36%、2.74%和 6.77%. 该方法快速、简单、灵敏, 能满足细胞内 AMP、ADP 和 ATP 含量的检测要求. 通过检测分析在不同浓度高良姜挥发油作用下人肺癌 A549 细胞内 AMP、ADP 和 ATP 含量变化, 结果显示细胞总的腺苷酸水平和能荷呈浓度依赖性下降, 且当浓度达到 500 mg/L 时 ATP/TAN 明显下降, 而 A549 细胞中 AMP/ATP 比例水平呈浓度依赖性增加. 这提示高良姜挥发油可通过影响细胞能量代谢抑制细胞增殖.

关键词 高效液相色谱-串联质谱, 腺苷酸, 能量代谢, 高良姜

学科分类号 O65, Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00186

腺苷酸, 包括三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)和单磷酸腺苷(AMP)是监测细胞内能量代谢变化的化合物, 腺苷酸作为能量供给和反应底物参与各种细胞内的生化过程^[1-2]. 建立灵敏和可信的分析方法检测细胞内微量的腺苷酸浓度变化, 准确获取细胞内能量代谢信息, 评价细胞能量代谢状态, 有助于阐明细胞增殖和凋亡的分子机制. 目前用于检测腺苷酸的方法有酶学法^[3]、高效液相色谱法(HPLC)^[4-5]、液相色谱-质谱法^[6-7]. 酶学法是把细胞提取物中的核苷磷酸酯经固相萃取分离核苷后, 用酶法去磷酸, 检测相应的核苷推测核苷酸的量. 强极性的阴离子交换柱可用于分离和直接测定核苷, 但是由于采用高盐的流动相洗脱核苷会影响它与质谱仪的联用^[8-9]. 由于腺苷酸的磷酸根上带负电荷, 极性很大, 很难在传统的反相色谱柱、离子抑制 HPLC 和毛细管电泳上保留, 而离子对

HPLC 可克服这一问题^[10-11]. 细胞样品中成分复杂, 影响检测的因素多^[12], 需要建立一种灵敏度高、精确度佳的检测腺苷酸微量浓度变化的方法. 采用离子对高效液相色谱/质谱(HPLC-MS/MS)联用技术, 应用超高效 HSS T3 液相柱有助于 ATP、ADP 和 AMP 3 种腺苷酸的保留和分离, 同时多反应监测扫描方式可提供特征的母离子及其子离子信息, 为目标化合物的定性与定量分析提供可靠依据. 本文研究建立 HPLC-MS/MS 检测细胞内腺苷酸浓度的方法, 并用该法分析高良姜挥发油对人非小细胞肺

* 广东省科技计划项目(2011B031700057), 广东省自然科学基金项目(S2011010004076), 广东医学院建博科技创新团队基金(STIF201115)和国家自然科学基金(81273549)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0759-2388138, E-mail: luohui@gdmc.edu.cn

收稿日期: 2012-04-16, 接受日期: 2012-05-18

癌 A549 细胞能量代谢状态的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器. Agilent 1200 型超高压液相色谱仪, 配备在线脱气机、自动进样器、柱温箱和可变波长检测器(美国 Agilent 公司); 电喷雾电离源(ESI, 美国安捷伦公司); Agilent 6430A 系列串联三重四极杆质谱(美国安捷伦公司); SB5200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 3K15 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

1.1.2 标准品. 5'-单磷酸腺苷二钠盐(5'-AMP 二钠盐)、5'-二磷酸腺苷二钠盐(5'-ADP 二钠盐)、5'-三磷酸腺苷二钠盐(5'-ATP 二钠盐)购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 试剂. 乙腈、甲酸均为色谱纯试剂(德国 Merck 公司); 甲酸铵为色谱纯试剂(美国 Sigma 公司); N, N-二甲基己胺(DMHA)(Sigma-Aldrich); 高氯酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、氢氧化钾、浓氨水均为分析纯级试剂; 实验用水为超纯水(美国 Millipore 公司超纯水器制备); 高良姜挥发油(广东医学院化学教研室提取); RPMI-1640 培养基、胰酶(美国 Gibco 公司); 优级胎牛血清(杭州四季青生物材料有限公司); MTT(美国 Sigma 公司)。

1.2 标准溶液的配制

准确称取一定量的 5'-AMP 二钠盐、5'-ADP 二钠盐和 5'-ATP 二钠盐固体标准品, 分别用超纯

水溶解定容得到 40 mg/L 的标准储备液, 在 -20℃ 下避光保存。临用时分别取储备液加超纯水稀释成浓度为 8.0、6.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.1 mg/L 系列混合标准工作溶液。

1.3 样品处理

分别收集各组细胞样品, 用 37℃ 预热的磷酸缓冲液洗涤细胞 2 次, 随即添加 490 μl 含有 Na-EDTA(1 mmol/L)的预冷高氯酸(0.3 mol/L), 立即涡旋混匀后低温超声裂解 2 min。4℃, 12 000 g 离心 5 min, 全部转移上清液于 EP 管中, 用 80 μl KOH(2 mol/L)溶液中和, 混匀后放 -20℃ 静置 3 h, 离心(4℃, 12 000 g, 5 min)除去沉淀物 KClO₄ 取上清液, 经 0.22 μm 膜过滤后置于 -20℃ 保存待测。

1.4 分析条件

1.4.1 色谱条件. Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 8 mmol/L DMHA 水溶液(用甲酸调至 pH=7); 流速: 0.25 ml/min; 线性洗脱程序: 0~5 min 80% B, 5~7 min 50% B, 7~7.10 min 95.0% B, 7.10~14 min 95.0% B; 柱温为 20℃, 进样量 15 μl。

1.4.2 质谱条件. 在多反应检测(MRM)模式下, 采用电喷雾离子(ESI)源(正离子模式), 毛细管电压为 4 000 V, 干燥气温度为 340℃, 干燥气流量为 9 L/min; 雾化器压力为 275.9 kPa(40 psi)。监测离子、碰撞能量及源内碎裂电压见表 1。

Table 1 MS parameters of ATP, ADP and AMP in the MRM mode

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Dwell time/ms	Fragmentor/V	Collision energy/V
ATP	636.7	508 ¹⁾	160	140	13
ADP	557	427.7 ¹⁾	160	115	2
AMP	477.4	347.5 ¹⁾	160	140	5

¹⁾Quantitative ion.

1.5 高良姜挥发油对 A549 细胞增殖的影响

1.5.1 细胞培养. 人非小细胞肺癌 A549 细胞保存于广东医学院天然药物重点实验室, 用含 10% 新生小牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的二氧化碳孵箱中培养, 取对数生长期细胞用于实验。

1.5.2 MTT 法检测高良姜挥发油对 A549 细胞增殖的影响. 取对数生长期的 A549 细胞, 接种 4 000 个/孔细胞悬液于 96 孔板中, 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 待细胞贴壁后, 更换含不同浓度的高良姜挥发油乳剂(0, 125, 250, 500 mg/L)的培养液, 每一浓度设 4 个平行孔。继续培养 24 h 后, 每孔加入 MTT(5 g/L) 20 μl, 继续孵育 4 h 后每孔加入

DMSO 150 μ l. 结晶完全溶解后, 立即用酶标仪检测各组 A 值. 实验重复 3 次. 按公式计算细胞增殖率: 细胞增殖率 = $(A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$.

1.5.3 应用 LC-MS/MS 检测高良姜挥发油影响 A549 细胞内腺苷酸的含量变化. 取对数生长期的 A549 细胞, 分别以 1×10^6 个接种于培养瓶培养, 待细胞贴壁后, 更换含不同浓度的高良姜挥发油乳剂(0, 125, 250, 500 mg/L)的培养液继续培养 24 h 后收集细胞, 按照 1.3 节方法处理细胞样品, 供上机检测.

2 结果与讨论

2.1 样品处理方法选择

从生物组织或食品中获取 ATP、ADP 和 AMP 的最常用方法是高氯酸提取法, 这是因为高氯酸能很好地沉淀蛋白质, 有效地降低蛋白质对磷酸腺苷分析的干扰^[13-14]. 加入高氯酸后, 细胞团瞬时形成不溶的团块, 导致细胞裂解不充分, 不能保证细胞内腺苷酸完全释放入裂解液. 采用冰浴超声裂解可避免提取物裂解不完全, 保证腺苷酸充分释放. 加入高氯酸充分涡旋后, 立即低温超声处理样品, 可保证裂解液均匀, 无不溶的团块, 说明细胞被完全裂解, 同时超声破坏细胞膜使细胞内腺苷酸充分释放到裂解液中. 因此, 选用裂解液合并超声裂解是一种提取效果最佳的方式. 氢氧化钾中和裂解液后, 低温放置可促进高氯酸钾很快析出, 3 h 后沉淀物不再增加, 低温高速离心后可完全将沉淀的高氯酸钾去除, 减少氯酸根对样品分析的影响^[15].

2.2 色谱条件的选择

本研究考察了以甲醇-水、乙腈-水混合溶剂体系为流动相以及流动相中分别添加 0.1% 甲酸、10 mmol/L 甲酸铵等溶液对 3 种腺苷酸的色谱行为和离子化程度的影响. 结果显示 AMP、ADP 和 ATP 在超高效反相色谱柱条件下保留效果很差, 需使用磷酸盐缓冲液或离子对试剂作为流动相才能保证 3 种腺苷酸的分离和保留, 又由于难挥发性磷酸盐不利于电离, 故最终选择添加离子对试剂作为流动相. 对于腺苷酸的分析, N, N-二甲基己胺 (DMHA) 作为离子对试剂比四烷基季铵盐效果好, 不会导致对 ESI/MS 检测的不良影响^[16]. 选用保留和分离极性有机物的超高效 HSS T3 色谱柱, 可以提高极性化合物的保留并与水相流动相“兼容”. 带正电荷的离子对试剂能够和带负电荷的腺苷酸之

间形成加合离子, 使其能够用反相高效液相色谱得以分离, 并且能够用正离子质谱检测. 但是离子对试剂 DMHA 在流动相中的浓度也会影响核苷保留和 ESI/MS 灵敏度^[16-18]. 实验结果表明, 当添加 8 mmol/L DMHA 作为水性流动相时, AMP、ADP 和 ATP 在色谱柱能获得良好的峰型和分离效果. 为了获得更好的分离度和峰形, 本文对其流速和梯度洗脱条件进行了优化. 结果表明, 以乙腈-8 mmol/L DMHA 水溶液为流动相, 流速为 0.25 ml/min, 梯度洗脱条件为 0~5 min, 80% B, 5~7 min, 80%B 降至 50%B, 7~7.10 min, 50%B 升至 95.0% B, 7.10~14 min, 维持 95.0% B, 柱温为 20℃ 时, 效果最佳. 在此条件下各组分的色谱图峰形较好, 并且在 5 min 内可完全分离(图 1).

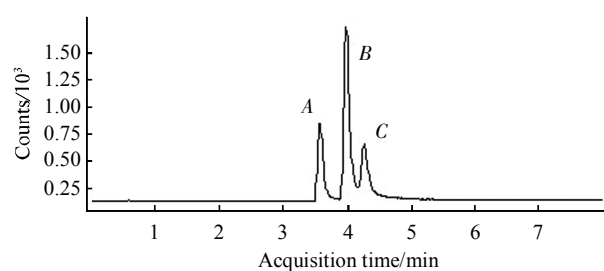


Fig. 1 Total ion chromatogram of a mixed standard solution

A: AMP; B: ADP; C: ATP.

2.3 质谱条件的优化

配制 2 mg/L 的 ATP、ADP 和 AMP 单标准工作液, 在 m/z 50~1000 范围内正、负离子模式下分别进行全扫描, 以选择合适的准分子离子峰和电离方式. 结果显示正离子模式的响应较高, m/z 636.7、 m/z 557 和 m/z 477.4 分别为 $[\text{DMHA}+\text{ATP}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{DMHA}+\text{ADP}+\text{H}]^+$ 及 $[\text{DMHA}+\text{AMP}+\text{H}]^+$ 的准分子离子峰. 在正离子模式下以准分子离子峰为母离子, 对其子离子 ATP (m/z 347.5)、ADP (m/z 427.7) 和 AMP (m/z 508) 进行全扫描, 以 MRM 模式进行检测. 在此基础上对锥孔电压和碰撞能进行优化, 使选定的母离子和子离子组成的特征离子的丰度和比例达到最佳. 最终确定 1.4.2 节所述的质谱条件, 图 2 显示在优化条件下目标分析物 ATP、ADP 和 AMP 的全扫描质谱图及子离子扫描质谱图.

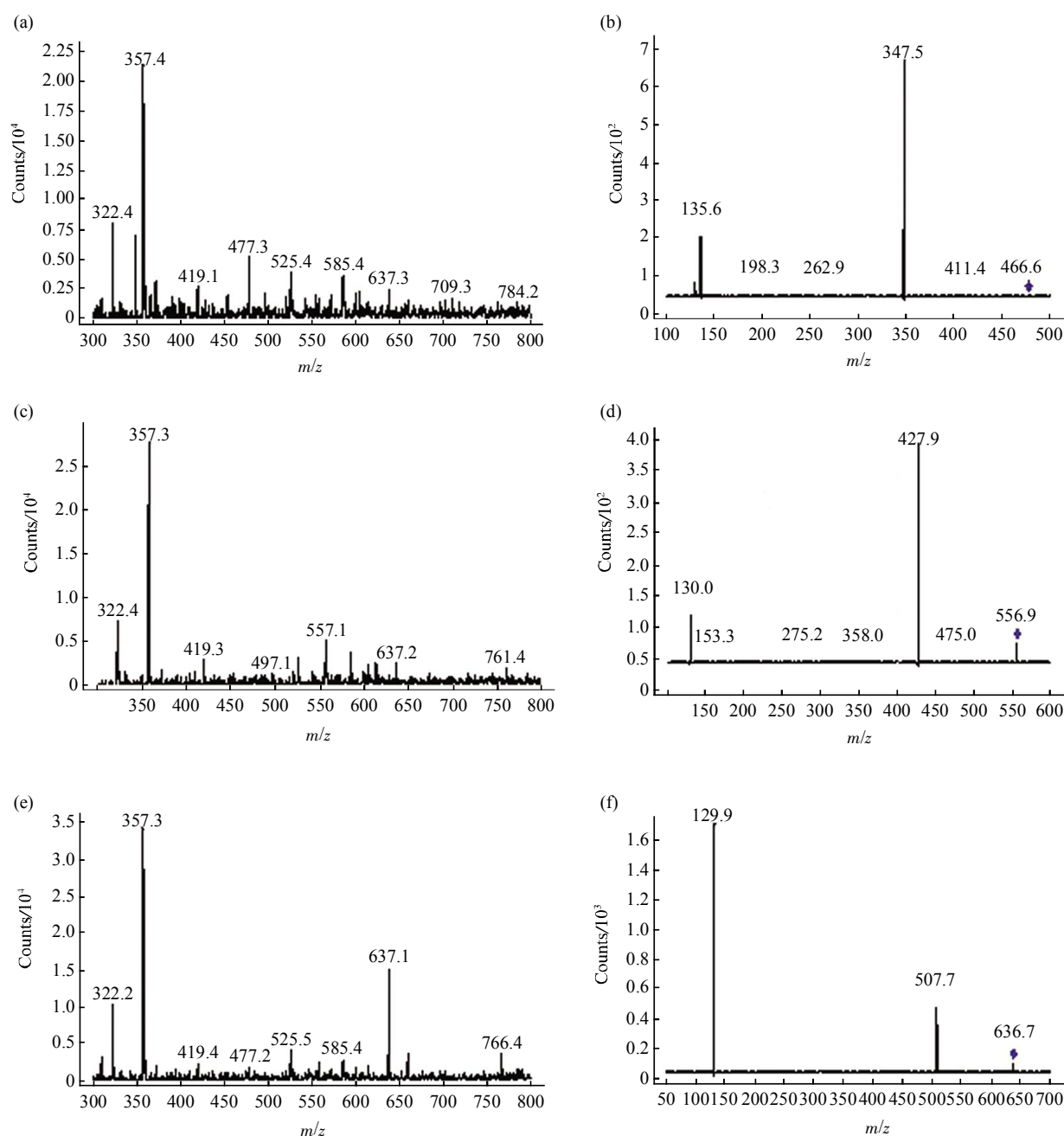


Fig. 2 Full scan and product ion scan mass chromatogram of AMP, ADP and ATP

(a) Full scan mass chromatogram of AMP. (b) Product ion scan mass chromatogram of AMP (m/z 347.5). (c) Full scan mass chromatogram of ADP. (d) Full scan mass chromatogram of ADP (m/z 427.9). (e) Full scan mass chromatogram of ATP. (f) Product ion scan mass chromatogram of ATP (m/z 507.7).

2.4 线性关系、检出限及定量限

在优化条件下,考察了 ATP、ADP 和 AMP 在一定浓度范围内的线性关系和相关系数。以 3 种腺苷酸的摩尔浓度(x , $\mu\text{mol/L}$)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得到线性回归方程及相关

系数,同时以 ATP、ADP 及 AMP 的特征离子色谱峰的信噪比(S/N) > 3 时为本方法的检出限, (S/N) > 10 时为本方法的定量限,结果见表 2。由表 2 可以看出 ATP、ADP 和 AMP 3 种腺苷酸均呈现良好的线性关系,相关系数(r)均大于 0.996。

Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients(*r*), limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of AMP, ADP and ATP

Analyte	Linear range/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Regression equation	<i>r</i>	LOD/($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ/($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
AMP	0.2003~16.0260	$y=288.3601x+133.6346$	0.9984	1.9291	1.9632
ADP	0.2342~18.7354	$y=625.1710x-461.0345$	0.9964	1.8794	1.9672
ATP	0.1814~14.5164	$y=236.4044x-105.1955$	0.9990	166.5	185.6

y: Peak area; *x*: Mass concentration, $\mu\text{mol/L}$.

2.5 回收率与精密度、重复性

分别向细胞样品中添加 0.1、2 和 4 mg/L 3 个不同水平浓度的 ATP、ADP 和 AMP 混标准溶液, 按优化的条件进行处理和测定, 计算各个添加水平的回收率和相对标准偏差(*RSD*). 结果表明, 该方

法的回收率和精密度均能达到要求(表 3). 取同一样品在同一天内 4、8、12 h 及在 1、2、3 天进行重复测试, 结果表明, AMP、ADP 和 ATP 的日内偏差(*RSD*)分别为 6.16%、5.13%和 7.66%, 日间偏差(*RSD*)分别为 6.36%、2.74%和 6.77%.

Table 3 Recoveries and precisions of ATP, ADP and AMP

Analyte	Added/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Found /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery/%	RSD/%
ATP	0.1	0.0830	83.0	2.62
	2.0	1.635	81.8	2.84
	4.0	3.817	95.4	6.99
ADP	0.1	0.0818	81.8	5.11
	2.0	2.140	107.0	1.75
	4.0	3.640	96.0	2.11
AMP	0.1	0.0838	83.8	2.92
	2.0	2.156	107.8	2.96
	4.0	3.790	94.8	7.55

2.6 高良姜挥发油抑制 A549 细胞增殖

MTT 结果显示, 不同浓度高良姜挥发油(125、250 及 500 mg/L)作用于 A549 细胞 24 h 后, 对其增殖有明显的抑制作用, 且呈浓度依赖性(图 3).

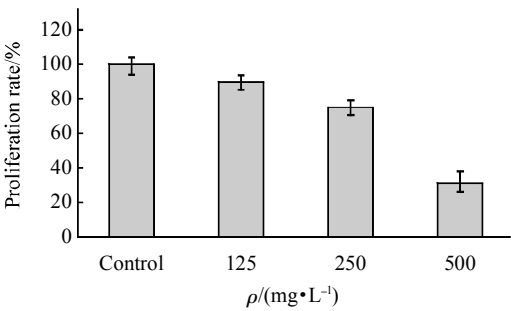


Fig. 3 The effect of volatile oils of *Alpinia officinarum* Hance on A549 cells proliferation

2.7 高良姜挥发油影响 A549 细胞能量代谢

利用上述所建立的分析方法检测细胞样品中 AMP、ADP 和 ATP 含量, 在此条件下各组分的质谱图峰形较好, 且与相应标准品的保留时间一致, 见图 4. 由于培养细胞样品中的细胞数量差异, 直接比较样品间的 AMP、ADP 和 ATP 水平不能准确体现细胞内能量代谢状态. 为消除细胞数引起的差异, 用细胞中总的腺苷酸水平(即 $\text{TAN}=\text{ATP}+\text{ADP}+\text{AMP}$)作为基准, 计算所测得的 ATP、ADP 和 AMP 比例水平和细胞能荷(ECP), 所得的转换值列于表 4. 细胞内腺苷酸库(TAN)的大小不仅反映了线粒体的氧化呼吸活性和生成高能磷酸化化合物的能力, 同时也反映了细胞的能量储备状态. 细胞能量代谢的状况可通过腺苷酸(ATP, ADP, AMP)含量的变化来反映. ECP 是生物组织能量状

态的指标, 能荷的大小决定腺苷库各成分比例, 它调节着组织的代谢活动^[19]. 由表 4 看出, 处理组细胞总的腺苷酸水平和能荷随着高良姜挥发油浓度增高而逐渐下降, 反映了该药物抑制 A549 细胞的能量代谢而影响了细胞的正常生长, 这与 MTT 法检测的结果相符. A549 细胞在不同浓度高良姜挥发油的作用下, 对 ADP/TAN 含量影响不大, 而 ATP/TAN 和 AMP/TAN 含量水平呈反比的变化, 且当浓度达到 500 mg/L 时 ATP/TAN 明显下降, 预示合成 ATP 能力已有所下降, 细胞能量供应不足.

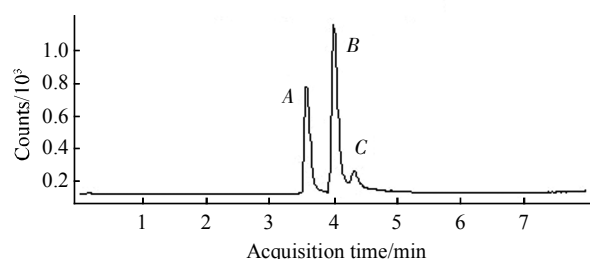


Fig. 4 Total ion chromatogram in A549 cell samples

A: AMP; B: ADP; C: ATP.

Table 4 Effects of cellular energy changes in A549 cell samples treated with volatile oils of *Alpinia officinarum* Hance

	Control	125 mg/L	250 mg/L	500 mg/L
TAN ¹⁾	26.327 ± 7.052	21.729 ± 6.736	20.684 ± 0.122	5.087 ± 0.822
ECP ²⁾	0.456 ± 0.001	0.441 ± 0.002	0.437 ± 0.025	0.367 ± 0.023
ATP/TAN	0.211 ± 0.021	0.208 ± 0.015	0.190 ± 0.008	0.128 ± 0.001
ADP/TAN	0.490 ± 0.039	0.479 ± 0.050	0.482 ± 0.049	0.479 ± 0.049
AMP/TAN	0.299 ± 0.015	0.313 ± 0.035	0.328 ± 0.041	0.393 ± 0.047
AMP/ATP	1.425 ± 0.057	1.503 ± 0.062	1.724 ± 0.138	3.076 ± 0.334

¹⁾ Total adenosine nucleotides; TAN = [ATP] + [ADP] + [AMP]. ²⁾ Energy charge potential; ECP = ([ATP] + 0.5[ADP])/TAN.

腺苷酸活化蛋白激酶(5'-AMP activated protein kinase, AMPK)是细胞内调控能量代谢的关键激酶, 相当于细胞内能量代谢的感受器和调节器, 其能监控细胞能量代谢状态的改变, 尤其是细胞内 AMP 和 ATP 的比例, 是反应细胞能量状态更加敏感的指标^[20-22]. 当细胞内能量耗竭时, AMP/ATP 比例上升, AMP 变构激活 AMPK, 引起下游信号分子的磷酸化, 一方面通过关闭消耗 ATP 的合成代谢通路如抑制糖原、脂肪和胆固醇的合成, 另一方面通过开启生成 ATP 的分解代谢通路如促进脂肪酸氧化、葡萄糖转运等^[23-25], 维持细胞总体能量代谢的平衡. 可见 AMPK 是细胞能量代谢的重要调节器, 但它还具有更多的功能, 如调节细胞的增殖和凋亡^[22, 26-27]. AMPK 信号通路整合了众多肿瘤抑制因子基因如 LKB1、p53、TSC1 和 TSC2, 且 AMPK 的活化可以拮抗多种刺激引起的生长因子信号通路的激活^[28-30]. 而实验结果中显示, 在高良姜挥发油作用时的 AMP/ATP 随着其浓度增高逐渐上升, 特别高浓度时其值是对照组的 2 倍多, 高 AMP/ATP 水平可能激活 AMPK, 但是否通过 AMPK 信号通路抑制肺癌细胞增殖或诱导细胞凋亡, 这需进一步加以探究.

3 结 论

利用高效液相色谱-串联质谱技术同时测定细胞中 ATP、ADP 和 AMP 的含量, 并对样品前处理条件及色谱、质谱条件进行了优化. 结果表明, 该方法的线性关系、回收率良好, 检出限较低, 具有定性和定量准确、快速的特点, 可以满足检测要求. 通过实际样品测定结果表明, 该方法具有良好的重现性和灵敏度. 在高良姜挥发油对 A549 细胞能量状态影响的研究中发现, 其总的腺苷酸水平和能荷呈浓度依赖性逐渐下降, 高浓度时 ATP/TAN 明显下降, 而细胞内 AMP/ATP 比例水平呈浓度依赖性上调. 本实验建立的方法为检测组织或细胞内腺苷酸浓度的变化, 分析细胞能量代谢状态的研究提供了有力的技术支持.

致谢 本研究在广东医学院粤西分析中心实验室和天然药物重点实验室完成, 感谢蔡春教授为本研究所提供的实验技术指导.

参 考 文 献

[1] Hardie D G, Hawley S A. AMP-activated protein kinase: the energy

- charge hypothesis revisited. *BioEssays*, 2001, **23**(12): 1112-1119
- [2] Manfredi G, Yang L, Gajewski C D, *et al.* Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods*, 2002, **26**(4): 317-326
- [3] Hearse D J. Microbiopsy metabolite and paired flow analysis: a new rapid procedure for homogenisation, extraction and analysis of high energy phosphates and other intermediates without any errors from tissue loss. *Cardiovasc Res*, 1984, **18**(6): 384-390
- [4] Napolitano M J, Shain D H. Quantitating adenylate nucleotides in diverse organisms. *J Biochem Biophys Methods*, 2005, **63**(1): 69-77
- [5] Dai R H, Liu H J, Qu J H. Extraction and analysis of adenosine phosphate in cells of microcystis aeruginosa. *Chinese J Analytical Chemistry*, 2007, **35**(12): 1701-1705
- [6] Wang J, Lin T, Lai J, *et al.* Analysis of adenosine phosphates in HepG-2 cell by a HPLC-ESI-MS system with porous graphitic carbon as stationary phase. *J Chromatogr B*, 2009, **877**(22): 2019-2024
- [7] Martin P, Josephine G, Richard F, *et al.* Nucleotide and nucleotide sugar analysis by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry on surface-conditioned porous graphitic carbon. *Anal Chem*, 2010, **82**(23): 9782-9788
- [8] Ritter J B, Genzel, Y, Reichl U. High-performance anion-exchange chromatography using on-line electrolytic eluent generation for the determination of more than 25 intermediates from energy metabolism of mammalian cells in culture. *Anal Technol Biomed Life Sci*, 2006, **843**(2): 216-226
- [9] Bennett P K, Li Y T, Edom R, *et al.* Quantitative determination of orlistat (tetrahydrolipostatin, Ro 18-0647) in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with ion spray tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom*, 1997, **32** (7): 739-749
- [10] Fung E N, Cai Z W, Burnette T C, *et al.* Simultaneous determination of Ziagen and its phosphorylated metabolites by ion-pairing high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2001, **754** (2): 285-295
- [11] Ganzera M, Vrabl P, Worle E, *et al.* Determination of adenine and pyridine nucleotides in glucose-limited chemostat cultures of *Penicillium simplicissimum* by one-step ethanol extraction and ion-pairing liquid chromatography. *Anal Biochem*, **359** (1): 132-140
- [12] Zhang W Z, He L J, Liu X, *et al.* Ionic liquids as mobile phase additives for separation of nucleotides in high-performance liquid chromatography. *Chin J Chem*, 2004, **22**(6): 549-552
- [13] Yang M S, Gupta R C. Determination of energy charge potential in the C6 glioma and the HepG-2 cell culture. *Toxicol Mech Method*, 2003, **13** (2): 97-101
- [14] 陈兰珍, 李桂芬, 薛晓峰, 等. 蜂王浆中磷酸腺苷的提取及超高效液相色谱分析. *色谱*, 2008, **26** (6): 736-739
- Chen L Z, Li G F, Xue X F, *et al.* *Chin J Chromatogr*, 2008, **26** (6): 736-739
- [15] Ushimaru M, Fukushima Y. Complete separation of adenine nucleotides for ATPase activity assay by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 2003, **313** (1): 173-175
- [16] Auriola S, Frith J, Rogers M J, *et al.* Identification of adenine nucleotide-containing metabolites of bisphosphonate drugs using ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 1977, **704** (1): 187-195
- [17] Cai Z, Song F, Yang M S. Capillary liquid chromatographic-high-resolution mass spectrometric analysis of ribonucleotides. *J Chromatogr A*, 2002, **976** (1-2): 135-143
- [18] Qian T X, Cai Z W, Yang M S. Determination of adenosine nucleotides in cultured cells by ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2004, **325**(1): 77-84
- [19] 高娜, 杨勇, 王世军, 等. HPLC 测定附子对大鼠肝组织中腺苷酸含量及能荷的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2010, **16**(15): 172-175
- Gao N, Yang Y, Wang S J. *Chin J Experimental Traditional Medical Formulae*, 2010, **16**(15): 172-175
- [20] Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, *et al.* Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J*, 2005, **24**(10): 1810-1820
- [21] Grahame Hardie D. AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 2011, **25**(18): 1895-1908
- [22] Hardie D G, Carling D, Gamblin S J. AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP?. *Trends Biochem Sci*, 2011, **36**(9): 470-477
- [23] Kahn B B, Alquier T, Carling D, *et al.* AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 2005, **1**(1): 15-25
- [24] Sambandam N, Lopaschuk G D. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog Lipid Res*, 2003, **42**(3): 238-256
- [25] 龙璐, 王平芳. LKB1-AMPK 信号通路 with 胰岛素抵抗. *中国糖尿病杂志*, 2007, **15**(6): 382-384
- Long L, Wang P F. *Chin J Diabetes*, 2007, **15**(6): 382-384
- [26] Rattan R, Giri S, Singh A K, *et al.* 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell Proliferation *in vitro* and *in vivo* via AMP- activated protein kinase. *J Biol Chem* 2005, **280**(47): 39582-39593
- [27] Xiang X, Saha A K, Wen R, *et al.* AMP-activated protein Kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321** (1): 161-167
- [28] Wang W, Guan K L. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol*, 2009, **196**(1): 55-63
- [29] 向波, 易梅, 李小玲, 等. 细胞自噬在肿瘤发生发展中的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2012, **39**(3): 241-249
- Xiang B, Yi M, Li X L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2012, **39**(3): 241-249
- [30] Ravikumar B, Sarkar S, Davies J E, *et al.* Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2010, **90**(4): 1383-1435

Establishment of High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Intracellular Adenosines Analysis and Its Applications*

LI Ning¹⁾, ZHANG Hai-Tao²⁾, LUO Hui^{1)**}, ZHANG Liang-Tao³⁾, XIONG Yong¹⁾, JIA Zhen-Bin¹⁾

¹⁾ Guangdong Medical College, School of Pharmacy, Zhanjiang 524023, China;

²⁾ Guangdong Medical College, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Zhanjiang 524023, China;

³⁾ Guangdong Medical College, Analysis Centre, Zhanjiang 524023, China)

Abstract The change of intracellular adenosines concentration is the sensor of cellular energy metabolism changes, and it will contribute to monitor the effect of drugs on cellular energy metabolism with establishment of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to detect intracellular adenosines concentration. The adenosines of cells were extracted by ultrasonic extraction with perchloric acid containing Na-EDTA. The chromatographic separation was achieved with a UPLC HSS T3 column and waters containing 8 mmol/L N, N-dimethylhexylamine (DMHA) and acetonitrile as mobile phases at 0.25 ml/min flow rate. The identification and quantification were achieved by using ESI-MS/MS in positive ion and with multiple reactions monitoring (MRM) mode. With linear ranges of AMP ((0.1814 ~ 14.5164) $\mu\text{mol/L}$), ADP ((0.2342 ~ 18.7354) $\mu\text{mol/L}$) and ATP ((0.2003 ~ 16.0260) $\mu\text{mol/L}$), the external calibration method was well used for the quantitation, and the correlation coefficient of AMP, ADP and ATP were 0.9984, 0.9964 and 0.9990 respectively. The limit of detections (LOD, $S/N > 3$) of AMP, ADP and ATP were 1.9291, 1.8794 and 166.5 nmol/L, and their limit of quantifications (LOQ, $S/N > 10$) were 1.9632, 1.9672 and 185.6 nmol/L, respectively. The recoveries of the spiked standards varied from 81.8% to 107.8% with relative standard deviations (RSDs) less than 7.55%. The intraday precisions of AMP, ADP and ATP were 6.16%, 5.13% and 7.66%, and their interday precisions were 6.36%, 2.74% and 6.77%, respectively. The method was fast, simple, sensitive and suitable for the quantitative analysis of AMP, ADP and ATP in cell extracts. Analysis of AMP, ADP and ATP in human lung cancer A549 cells treated with different concentration volatile oils of *Alpinia officinarum* Hance, the results showed that the total level of cellular adenylate energy and ECP were decline with concentration dependence. The levels of ATP/TAN were decreased significantly when the concentration was 500 mg/L but the level of AMP/ATP in A549 cells were increased with concentration dependent. It was suggested that the volatile oils of *Alpinia officinarum* Hance inhibited cell proliferation by affecting the cellular energy metabolism.

Key words high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), adenosine, energy metabolism, *Alpinia officinarum* Hance

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00186

*This work was supported by grants from Science and Technology Projects of Guangdong Province (2011B031 700057), Guangdong Natural Science Foundation (S2011010004076), Science & Technology Innovation Fund of Guangdong Medical College (STIF201115) and The National Natural Science Foundation of China (81273549).

**Corresponding author.

Tel: 86-759-2388138, E-mail: luohui@gdmc.edu.cn

Received: April 16, 2012 Accepted: May 18, 2012