基于液相色谱分离技术的核酸类药物生物分析方法研究进展Δ

孙淑萌[1*]，林　琳[1,2]，张岱州[1,2]，李　欣[3]，关永霞[3]，陈　凯[1,2,4#]（1.山东省药学科学院，济南　250101；2.山东省人工噬菌体药物技术创新中心，济南　250101；3.鲁南制药集团股份有限公司，山东 临沂　276000；4.山东中医药大学中医药创新研究院，济南　250001）

中图分类号　R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）23-2959-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.23.20

摘　要　核酸类药物的生物分析方法主要有基于配体结合分析、基于聚合酶链反应和基于液相色谱分离技术3大类，前两者灵敏度虽高，但选择性较差，很难区分寡核苷酸本身及其较短的代谢产物。基于液相色谱分离技术生物分析方法的灵敏度虽略有逊色，但由于其具有高选择性，能够区分寡核苷酸本身及其代谢产物，故在核酸类药物的临床前和临床研究中展现出了广阔的应用前景。本文综述了该类方法中的高效液相色谱-紫外检测（HPLC-UV）法、高效液相色谱-荧光（HPLC-FL）法、液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）法、液相色谱-高分辨质谱法、微流液相色谱-串联质谱（microflow LC-MS/MS）法、杂交液相色谱-串联质谱法的特点及其在核酸类药物分析中的应用情况，发现除HPLC-UV法的检测灵敏度较低以外，其余方法均具有较高的灵敏度，但尚存在一些不足，如HPLC-FL法需要设计合适的探针、LC-MS/MS法需要标准物质、microflow LC-MS/MS法成本较高等。另外，一些相关策略及技术（如非特异性吸附解决策略、样品前处理技术等）的发展，在提高方法灵敏度的同时，也进一步加速了基于液相色谱分离技术的核酸类药物生物分析方法的发展。

关键词　核酸类药物；寡核苷酸；生物分析；液相色谱；分离技术

Liquid chromatography-based bioanalytical technologies for nucleic acid drugs

SUN Shumeng[1], LIN Lin[1,2], ZHANG Daizhou[1,2], LI Xin[3], GUAN Yongxia[3], CHEN Kai[1,2,4]（1. Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China; 2. Shandong Innovation Center of Engineered Bacteriophage Therapeutics, Jinan 250101, China; 3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shandong Linyi 276000, China; 4. Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001, China）

ABSTRACT　There are three types of bioanalytical methods for nucleic acid drugs, including ligand binding assay, quantitative polymerase chain reaction and liquid chromatography-based bioanalytical technologies. Although the first two assays have high sensitivity, they have poor selectivity and can not differentiate between intact and truncated metabolites. Liquid chromatography-based bioanalytical technologies which are less sensitive, offer high selectivity for the identification of intact and truncated metabolites. They have broad application prospects in both preclinical and clinical investigations of therapeutic nucleic acid drugs. This paper provides a critical review on the characteristics of these technologies and their application to analyze nucleic acid drugs, including high performance liquid chromatography-ultraviolet detection (HPLC-UV), high performance liquid chromatography-fluorescence (HPLC-FL), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry, microflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry (microflow LC-MS/MS) and hybridization liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Although these technologies have high sensitivity except for HPLC-UV, they still have some shortcomings, such as suitable probes need to be designed for HPLC-FL, standard substance for LC-MS/MS, and high cost for microflow LC-MS/MS. In addition, the development of some related strategies or technologies (e.g. non-specific adsorption strategy, sample pretreatment) which can improve the sensitivity, has hastened the development of liquid chromatography-based bioanalytical technologies for nucleic acid drugs.

KEYWORDS　nucleic acid drugs; oligonucleotide; bioanalysis; liquid chromatography; separation technology

核酸类药物通过Watson-Crick碱基互补配对机制特异性识别内源性核酸序列，能够精准调控基因表达，比小分子药物更具特异性[1]，因此近年来其应用潜力备受关注。核酸类药物主要包括反义寡核苷酸（antisense oligonucleotides，ASO）药物、小干扰RNA（small interfering

Δ**基金项目**　山东省重点研发计划（重大科技创新工程）项目（No. 2021CXGC010515）

＊**第一作者**　工程师，硕士。研究方向：新药药代动力学。电话：0531-88562151。E-mail：sunshumeng.123@163.com

＃**通信作者**　高级工程师，硕士生导师，博士研究生。研究方向：新药药代动力学。电话：0531-88562177。E-mail：chenkai@sdaps.cn

RNA，siRNA）药物、微小RNA药物和适配体药物[2]。自1998年首款ASO药物Vitravene®（formivirsen）获批上市以来[3]，截至2024年5月国际上已有20个核酸类药物获得上市批准[4]。

核酸类药物的生物分析方法主要有3大类，包括基于配体结合分析（ligand binding assay，LBA）的分析方法、基于定量聚合酶链反应（quantitative polymerase chain reaction，qPCR）的分析方法和基于液相色谱分离技术的分析方法。LBA分析方法通常是指酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）法，包括一步杂交法、两步杂交法、三明治杂交法、双链杂交法和竞争杂交法。该类分析方法几乎不需要样品处理，灵敏度高，但会受到代谢产物的干扰，尽管后续开发的杂交方法能适当提高选择性，但这种选择性仍不可预测[5]。qPCR分析方法主要包括茎环法、引物延伸qPCR法、Poly A聚合酶加尾法、qPCR探针法等。该类分析方法检测灵敏度最高，可达fg/mL水平，但无法区分寡核苷酸本身及其主要较短代谢产物[6]，加上引物和探针的设计存在一定难度，故应用受限。

基于液相色谱分离技术的分析方法因具有高选择性，故能够通过调整色谱条件实现寡核苷酸本身及其代谢产物的分离和定量分析。该类分析方法虽灵敏度略有逊色，但解决了前两类分析方法中代谢产物干扰的问题[7]，成为了核酸类药物生物分析的重点开发方法。该类方法主要包括：高效液相色谱-紫外检测（high performance liquid chromatography-ultraviolet detection，HPLC-UV）法、高效液相色谱-荧光（high performance liquid chromatography-fluorescence，HPLC-FL）法、液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）法、液相色谱-高分辨质谱（liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry，LC-HRMS）法、微流液相色谱-串联质谱（microflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry，microflow LC-MS/MS）法、杂交液相色谱-串联质谱（hybridization liquid chromatography-tandem mass spectrometry，hybridization LC-MS/MS）法。本文综述了基于液相色谱分离技术的分析方法的特点和在核酸类药物生物分析中的应用情况，以期为核酸类药物临床前和临床研究中生物样品分析方法的开发提供参考。

1 HPLC-UV法

HPLC-UV法常用于寡核苷酸的制备和纯度验证[8]。使用该法时，寡核苷酸的分离受固定相孔径、流动相添加剂和柱温的影响[9]。Umemura等[10]用HPLC-UV法检测defibrotide（单链寡核苷酸颗粒的多分散混合物，一种ASO药物）在人血浆中的浓度，检测线性范围为10～300 μg/mL。Nuckowski等[11]采用HPLC法，在260 nm紫外吸收波长下对硫代磷酸寡核苷酸的固相萃取（solid-phase extraction，SPE）法进行了优化，包括吸附剂的种类、洗脱溶剂的种类及浓度，最终采用液-液萃取（liquid-liquid extraction，LLE）-SPE联合技术对人血浆中的硫代磷酸寡核苷酸及其2种代谢产物进行了定量分析。虽然HPLC-UV法相对简单，但检测灵敏度较低，无法用于低浓度样品的生物分析。

2 HPLC-FL法

基于肽核酸（peptide nucleic acid，PNA）杂交的HPLC-FL法是使用荧光标记的PNA探针与寡核苷酸碱基配对形成杂交双链体，再采用HPLC法进行检测。该方法近几年已逐步用于血浆及组织中寡核苷酸的定量分析，其融合了ELISA和HPLC 2种方法的优点，定量下限（lower limit of quantification，LLOQ）可达1 ng/mL，甚至更低[12]。目前已上市的寡核苷酸类药物patisiran就是采用该法测定的其在临床前及临床样品中的含量，并完成了其药代动力学研究[13]。该法通过阴离子交换色谱进行分离，还能有效区分代谢产物，包括3′端、5′端代谢产物[14]及5′端磷酸化代谢产物[15]。Ji等[16]研究发现，PNA探针的长度对PNA/脱氧寡核苷酸（oligodeoxynucleotide，ODN）杂交复合物的峰形和色谱分离度至关重要，在PNA/ODN杂交复合物稳定的情况下，较短的PNA探针表现得更好。该研究还采用ATTO染料标记的12-mer PNA探针对人血浆中DNL1818（18-mer，一种磷酸二酯ODN药物）的HPLC-FL测定方法进行了验证，所得LLOQ可达0.1 ng/mL。HPLC-FL法灵敏度高、特异性好、血浆样品用量少、无需特殊提取，唯一的挑战是需要设计合适的探针，导致需要更长的方法开发时间，因此通常用于临床研究或临床前研究的后期试验。

3 LC-MS/MS法

LC-MS/MS法结合了液相色谱的分离能力和质谱的分析能力，可以高灵敏和高选择性地进行核酸分析，实现核酸及其代谢产物的定性和定量，有望成为核酸类药物生物分析的首选方法[17]。其中，三重四极杆LC-MS/MS法的应用最为广泛，多采用反相离子对色谱法。Ewles等[18]采用AB Sciex API 5000三重四极杆LC-MS/MS系统对人血浆中的trabedersen（一种反义ODN药物）及其6种3′端和5′端代谢产物（5′n-1、3′n-1、5′n-2、3′n-2、5′n-3、3′n-3）进行了定量分析，以水-六氟异丙醇-三乙醇胺（100∶1∶0.1，*V*/*V*/*V*）和甲醇-六氟异丙醇-三乙醇胺（100∶1∶0.1，*V*/*V*/*V*）为流动相进行梯度洗脱，可得每种待测成分的线性范围均为2～1 000 ng/mL。Ledvina等[19]采用AB Sciex 6500+三重四极杆LC-MS/MS系统建立了人血浆中AZD8233[16-mer，一种*N*-乙酰半乳糖胺（GalNAc）偶联的硫代磷酸酯修饰的寡核苷酸药物]的测定方法，成功地将AZD8233与AZD8233-DG（AZD8233的去糖基化或部分去糖基化形式）进行了分离，LLOQ可达0.2 ng/mL。Hemsley等[20]使用在线固相萃取（online SPE，OLSPE）-LC-MS/MS系统建立了人血浆中15-mer未修饰的单链DNA寡核苷酸药物的测定方法，以水（内含

15 mmol/L 三乙醇胺+400 mmol/L 六氟异丙醇）和甲醇-水（50∶50，*V*/*V*，内含 15 mmol/L 三乙醇胺+400 mmol/L 六氟异丙醇）为流动相进行梯度洗脱，LLOQ 可达 50 pg/mL。

近年来，质谱与亲水作用色谱（hydrophilic interaction liquid chromatography，HILIC）联合的 HILIC-MS/MS 法引起了广泛关注，因其流动相多为挥发性盐，相对于反相离子对色谱，与质谱更为兼容，不易引起质谱系统的污染，故已逐渐用于核酸类药物的生物分析[21]。在流动相的选择中，与甲酸铵相比，乙酸铵因其更好的质谱灵敏度、更强的色谱保留性而备受青睐。Zhang 等[22]采用 AB Sciex API 5000 三重四极杆 HILIC-MS/MS 系统建立了兔血浆中 nusinersen（一种硫代磷酸酯修饰的 ASO 药物）的测定方法，在流动相中添加 20 mmol/L 乙酸铵并将 pH 值调整为 10 时，电离效率最高、峰形最好，LLOQ 可达 30 ng/mL。该研究采用此法完成了 nusinersen 单次鞘内注射给药和单次静脉注射给药后的药代动力学研究。

LC-MS/MS 法因其高分离能力及高选择性，能同时完成核酸本身及其代谢产物的分离与定量，但需在标准物质存在的前提下完成，故其应用受到了一定限制。

4 LC-HRMS 法

目前，LC-HRMS 法已广泛用于大分子药物的生物分析[5]，具有超高的质量分辨率和质量准确度（小于 5 ppm），并在没有对照品的情况下可以实现代谢产物的定性及定量，逐渐成为核酸及其代谢产物分析的重要技术之一[12]。近年来核酸类药物分析应用最为广泛的高分辨质谱主要有四极杆-静电场轨道阱质谱[23－26]和四极杆串联飞行时间质谱（quadrupole time-of-flight mass spectrometry，Q-TOF MS）。

Ji 等[12]采用四极杆-静电场轨道阱质谱法对食蟹猴高浓度血浆、肝脏、肾脏和尿液 4 种基质中的 RBD1016（一种 GalNAc 偶联的 siRNA 药物，包含反义链和有义链）及其代谢产物进行了定性和定量分析，发现 RBD1016 的反义链在 4 种基质中的代谢产物是相同的，RBD1016 的有义链在 4 种基质中的代谢产物存在差异。Li 等[24]采用四极杆-静电场轨道阱质谱的 3 种模式对 REVERSIR-A（一种单链 GalNAc 偶联的寡核苷酸药物）及其代谢产物进行了分析，选择全扫描模式用于代谢产物的鉴定（扫描范围为 *m*/*z* 500～2 000），选择离子检测模式和平行反应监测模式用于定量分析，分辨率分别为 70 000 和 35 000。该研究发现了仅存在于食蟹猴肝脏中的 REVERSIR-A 的一种新的代谢产物，是由 3′末端的 2′-*O*-甲基腺苷转化成的 2′-*O*-甲基肌苷，这是首次观察到的外源性给药寡核苷酸末端腺苷的 A-to-I 编辑，两者分子量仅相差 0.984 Da。Liu 等[25]也用四极杆-静电场轨道阱质谱法对大鼠肝脏匀浆中 2 种不同修饰的寡核苷酸 N11-GalNAc（经硫代磷酸酯、2′-氟、2′-甲氧基和 3′-GalNAc 修饰的 21-mer RNA，分子量为 8 590.218 8 Da）和 N9（经硫代磷酸酯和 2′-氟修饰的 21-mer RNA，分子量为 6 674.996 1 Da）的代谢产物进行了鉴定，结果分别鉴定出 27 和 29 种代谢产物。Sun 等[26]采用四极杆-静电场轨道阱质谱法对大鼠血浆中的 mipomersen（一种 ASO 药物）进行了测定，并进行了完整的方法学验证，所得 LLOQ 可达 0.5 ng/mL。

Li 等[27]采用 Q-TOF MS 法对一种肝靶向的 ASO 药物 AZD8233 的 11 种代谢产物进行了研究，并证实了动物体内代谢产物与人体内代谢产物的一致性。Kilanowska 等[28]采用 Q-TOF MS 法对 4 种不同修饰（分别经硫代磷酸酯、2′-甲氧基、2′-甲氧乙基、碱基修饰）的 ASO 药物在人肝微粒体孵育后的代谢产物进行了研究，结果显示，这些 ASO 药物的主要代谢途径均为核酸外切酶进行的 3′末端及 5′末端的代谢。该研究还发现，代谢产物的数量随着化学修饰引起的寡核苷酸极性的降低而减少，硫代磷酸酯修饰的 ASO 数量＞碱基修饰的 ASO 数量＞2′-甲氧基修饰的 ASO 数量＞2′-甲氧乙基修饰的 ASO 数量。

LC-HRMS 法能够同时鉴定及定量未知代谢产物，无须使用标准物质；与 LC-MS/MS 法相比，LC-HRMS 法的高分辨率及高质量准确度更能够区分结构相似的代谢产物。一般来说，随着寡核苷酸长度的增加会导致质谱检测灵敏度的降低，因此 LC-MS/MS 法与 LC-HRMS 法适合分析分子量较小的核酸类药物。

5 microflow LC-MS/MS 法

近年来，microflow LC-MS/MS 法因其超高的灵敏度而备受关注。据文献报道，微流液相色谱（流速为 10～100 μL/min）可提高电喷雾质谱中分析物的电离效率，这是因为在低流速下产生的较小液滴具有较大的表面积与体积比，从而提供了更高的电离效率[29]。Jiang 等[30]开发了一种用于大鼠血浆中 ASO 药物定量分析的 microflow LC-MS/MS 法，灵敏度可达 0.1 ng/mL；相对于常规的液相色谱，微流液相色谱的灵敏度提高了 4～6 倍，且针对洁净程度越高的样本，该方法的灵敏度也越高。Guimaraes 等[31]将微流液相色谱与多通道纳升电喷雾质谱相结合用于核酸类药物的分析，结果发现，多通道纳升电喷雾使寡核苷酸的检测灵敏度提高了 300%。

microflow LC-MS/MS 法的灵敏度高，且由于流速慢，其流动相的消耗量也极少，因此对质谱的污染较小；而且，较少量的溶液进入离子源，还有效降低了基质效应。但特定的仪器决定了其较高的设备成本，故该技术还未得到广泛应用。

6 hybridization LC-MS/MS 法

hybridization LC-MS/MS 法在保持了 LC-MS/MS 法高选择性的同时，其灵敏度可与 LBA 法媲美，已成为近年来重点开发的方法。该法采用生物素化的捕获探针

偶联磁珠杂交法从生物样本中提取核酸，然后用LC-MS/MS法进行分析，最早由Dillen等[32]于2017年报道。与传统的LC-MS/MS法相比，该法所需样本量更小，96孔板即可批量处理样品，耗时更短，且方法更为稳定。Li等[33]开发了用于大鼠血浆和脑组织样品中ASO药物定量分析的hybridization LC-MS/MS法，能特异性地区分ASO及其n-1代谢产物，实现ASO药物及其代谢产物的同时定量；且该法灵敏度高，大鼠血浆中的LLOQ可达0.5 ng/mL，脑组织中的LLOQ可达2.50 ng/g。Li等[34]首次建立了猴血清、脑脊液、组织中ASO-001（一种具有20个碱基对的ASO药物）定量分析的hybridization LC-MS/MS法，并证实了该法不受ASO-001 5种3′端和5′端代谢产物（3′n-1、3′n-10、5′n-10、3′n-15、5′n-15）的干扰；同时，该研究团队还进行了ASO-001用于猴的毒代动力学研究，所得LLOQ可达0.5 ng/mL。Yuan等[35]首次将hybridization LC-MS/MS法用于猴血清、脑脊液、组织中siRNA-01（一种双链寡核苷酸药物）的测定，使用PNA探针作为捕获探针，获得了满意的回收率（约90%），且测定过程不受推测的30个n-1代谢产物的干扰，LLOQ为2 ng/mL，且该法还可用于其他siRNA药物及双链寡核苷酸药物的生物分析。

hybridization LC-MS/MS法具有与传统ELISA法相当的灵敏度，且样品制备过程简单，不涉及提取等复杂操作，但生物素化的捕获探针需要特殊试剂的设计和合成，开发周期相对较长。

7 其他相关策略及技术

近年来，为进一步提高基于液相色谱分离技术的分析方法的灵敏度，解决核酸的非特异性吸附问题和优化样品前处理技术成为了主要路径。

7.1 非特异性吸附解决策略

解决核酸的非特异性吸附问题，可减少样品的损失，提高分析物的回收率，从而提高分析方法的灵敏度。Nguyen等[36]采用HPLC-UV及LC-MS/MS法，以25-mer硫代磷酸酯寡核苷酸及不同聚合度的寡聚胸腺嘧啶脱氧核苷酸（15-mer、20-mer、25-mer、30-mer、35-mer）为研究对象，对非特异性吸附问题进行了系统研究。结果表明，金属材质的液相色谱硬件（色谱柱和液相色谱系统）引起的非特异性吸附问题可以通过增加进样次数来解决，但这种解决办法只是短暂的，且重复性不好；表面混合二氧化硅修饰材质的液相色谱硬件几乎不存在非特异性吸附问题，相对于金属材质的液相色谱硬件，可使25-mer硫代磷酸酯寡核苷酸的回收率提高73%。该研究同时对流动相pH值（4、7、8.5）对结果的影响进行了评估，发现当流动相pH值为8.5时，25-mer硫代磷酸酯寡核苷酸的回收率最高。Zhang等[37]报道使用硅烷化玻璃容器配制溶液，并在溶剂中添加离子对试剂（六氟异丙醇、三乙醇胺）可以减少寡核苷酸的非特异性吸附。另外，流动相中螯合剂（如乙酰丙酮）的添加、样品中阻断剂（如牛血清蛋白）和表面活性剂（如吐温80）的加入都可以减少寡核苷酸的非特异性吸附[30,34,38]；流动相或工作溶液中有机溶剂的浓度也会影响寡核苷酸的非特异性吸附[39－40]。

7.2 样品前处理技术

样品的前处理是将目标寡核苷酸及其代谢产物从基质及大分子蛋白中分离出来的关键步骤，对于提高基于液相色谱分离技术的分析方法灵敏度至关重要。目前常见的样品前处理方法主要有蛋白沉淀法、LLE法、SPE法。其中，蛋白沉淀法存在较低的回收率和较高的基质效应，应用较少[30,41]。LLE法及SPE法单独用于寡核苷酸的样品制备虽然能得到足够的回收率[42－45]，但单独的前处理方法往往不能完全除去蛋白质，直接影响方法的灵敏度，因此业界常常将两者结合，用于样品前处理[11,18]。研究表明，LLE联合SPE法用于人血浆中AZD8233的测定时，LLOQ可达0.2 ng/mL[19]。随着前处理方法的进一步改进，OLSPE法也被开发出来，当其用于人血浆中寡核苷酸的测定时，LLOQ可达50 pg/mL，比传统SPE法的灵敏度提高了5倍[20]。近年来，迅速发展的杂交提取法备受关注，因具有高度的特异性，该方法可以为各种生物基质（如血浆、组织匀浆液、脑脊液）中的核酸类药物进行高效的样品提取[34]，已成为无可替代的一种前处理方法。杂交提取法与microflow LC-MS/MS法的结合更是将寡核苷酸的测定方法推上了一个新的高度，采用生物素化的捕获探针偶联磁珠杂交提取法对大鼠血浆中的ASO药物进行提取，再使用microflow LC-MS/MS法进行测定，灵敏度可达0.1 ng/mL[30]。

7.3 其他

另外，还有一些在小分子化合物中应用得比较成熟的分离技术也在近年中用于核酸类药物的生物分析。例如毛细管微取样（capillary microsampling，CMS）法，即使用毛细管收集少量血液，并使收集的血液在毛细管中进一步处理成血浆或血清，然后与样品用量较少的hybridization LC-MS/MS法结合，从而在取样量较少的同时保证较高的方法灵敏度。Yuan等[46]首次将CMS法与hybridization LC-MS/MS法联合用于幼年小鼠血浆样品中一种ASO药物（20-mer，分子量为7 100Da）的分析，并成功完成了该药的药代动力学及毒代动力学评估。

8 结语

随着生物分析技术的不断发展，基于液相色谱分离技术的分析方法也逐渐完善，基于PNA杂交的HPLC-FL法、LC-HRMS法、microflow LC-MS/MS法、hybridization LC-MS/MS法和OLSPE-LC-MS/MS法等，在保持了原有基于液相色谱分离技术分析方法（如HPLC-UV法）

的高选择性的同时，也弥补了其灵敏度不够高的不足。由于寡核苷酸固有的多阴离子性质，其生物分析方法的灵敏度在很大程度上取决于其分子大小。当寡核苷酸长度增加时，LC-MS/MS法和LC-HRMS法的灵敏度会降低，而hybridization LC-MS/MS法的灵敏度则会提高。

多数基于液相色谱分离技术的分析方法不需要特殊试剂的设计和合成，方法开发周期短，可大大加快药物研发的速度。因此，在早期体内外的药物筛选和非临床研究中，该类分析方法可以代替ELISA法和qPCR法对含核酸类药物的生物样品进行定性和定量分析，从而提供更加有效、灵敏、快速和精确的实验数据。相信随着科技的发展，未来将会有更多新技术应用到核酸类药物的生物分析中。

参考文献

[1] MOUMNÉ L, MARIE A C, CROUVEZIER N. Oligonucleotide therapeutics: from discovery and development to patentability[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(2): 260.

[2] YU A M, CHOI Y H, TU M J. RNA drugs and RNA targets for small molecules: principles, progress, and challenges[J]. Pharmacol Rev, 2020, 72(4): 862-898.

[3] ROEHR B. Fomivirsen approved for CMV retinitis[J]. J Int Assoc Physicians AIDS Care, 1998, 4(10): 14-16.

[4] LARDEUX H, D'ATRI V, GUILLARME D. Recent advances and current challenges in hydrophilic interaction chromatography for the analysis of therapeutic oligonucleotides[J]. Trac Trends Anal Chem, 2024, 176: 117758.

[5] KOTAPATI S, DESHPANDE M, JASHNANI A, et al. The role of ligand-binding assay and LC-MS in the bioanalysis of complex protein and oligonucleotide therapeutics[J]. Bioanalysis, 2021, 13(11): 931-954.

[6] CASTELLANOS-RIZALDOS E, BROWN C R, DENNIN S, et al. RT-qPCR methods to support pharmacokinetics and drug mechanism of action to advance development of RNAi therapeutics[J]. Nucleic Acid Ther, 2020, 30(3): 133-142.

[7] 程忠哲，姜宏梁. 核酸类药物生物分析方法研究进展[J]. 药学学报，2021，56(9)：2335-2345.
CHENG Z Z, JIANG H L. Advances in the bioanalysis of therapeutic oligonucleotides[J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(9): 2335-2345.

[8] PEREZ C, RANI M, PHAN T. Optimization of high-performance liquid chromatography parameters for purification of oligonucleotide-A[J]. Am J Anal Chem, 2022, 13(2): 39-50.

[9] TAKANO T, AOYAMA C, TERASAKI Y, et al. Ion-pair reversed-phase liquid chromatographic separation of oligonucleotides[J]. Anal Sci, 2021, 37(12): 1811-1814.

[10] UMEMURA K, IWAKI T, KIMURA T, et al. Pharmacokinetics and safety of defibrotide in healthy Japanese subjects[J]. Clin Pharmacol Drug Dev, 2016, 5(6): 548-551.

[11] NUCKOWSKI Ł, KACZMARKIEWICZ A, STUDZIŃSKA S. Development of SPE method for the extraction of phosphorothioate oligonucleotides from serum samples[J]. Bioanalysis, 2018, 10(20): 1667-1677.

[12] JI Y H, GUO Z X, YAN M, et al. Metabolite identification and quantitation of RBD1016 siRNA: a direct comparison of hybridization-based LC-FD and LC-HRAM assays[J]. Bioanalysis, 2024, 16(2): 91-105.

[13] ZHANG X P, GOEL V, ROBBIE G J. Pharmacokinetics of patisiran, the first approved RNA interference therapy in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis[J]. J Clin Pharmacol, 2020, 60(5): 573-585.

[14] TIAN Q G, ROGNESS J, MENG M, et al. Quantitative determination of a siRNA (AD00370) in rat plasma using peptide nucleic acid probe and HPLC with fluorescence detection[J]. Bioanalysis, 2017, 9(11): 861-872.

[15] TRUBETSKOY V S, GRIFFIN J B, NICHOLAS A L, et al. Phosphorylation-specific status of RNAi triggers in pharmacokinetic and biodistribution analyses[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(3): 1469-1478.

[16] JI Y H, LIU Y J, XIA W H, et al. Importance of probe design for bioanalysis of oligonucleotides using hybridization-based LC-fluorescence assays[J]. Bioanalysis, 2019, 11(21): 1917-1925.

[17] LIU A W, CHENG M, ZHOU Y X, et al. Bioanalysis of oligonucleotide by LC-MS: effects of ion pairing regents and recent advances in ion-pairing-free analytical strategies[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24): 15474.

[18] EWLES M, GOODWIN L, SCHNEIDER A, et al. Quantification of oligonucleotides by LC-MS/MS: the challenges of quantifying a phosphorothioate oligonucleotide and multiple metabolites[J]. Bioanalysis, 2014, 6(4): 447-464.

[19] LEDVINA A R, EWLES M, SEVERIN P, et al. High-sensitivity workflow for LC-MS-based analysis of GalNAc-conjugated oligonucleotides: a case study[J]. Bioanalysis, 2021, 13(17): 1343-1353.

[20] HEMSLEY M, EWLES M, GOODWIN L. Development of a bioanalytical method for quantification of a 15-mer oligonucleotide at sub-ng/mL concentrations using LC-MS/MS[J]. Bioanalysis, 2012, 4(12): 1457-1469.

[21] GOYON A, FAN Y C, ZHANG K. Liquid chromatography: analysis of oligonucleotides by liquid chromatography[M]. Amsterdam: Elsevier, 2023: 357-380.

[22] ZHANG X, SHA C J, ZHANG W, et al. Development and validation of an HILIC/MS/MS method for determination of nusinersen in rabbit plasma[J]. Heliyon, 2024, 10(10): e31213.

[23] LI J, LIU J, ZHANG X M, et al. Nonclinical pharmacokinetics and absorption, distribution, metabolism, and excretion of givosiran, the first approved N-acetylgalactosamine-conjugated RNA interference therapeutic[J]. Drug Metab Dispos, 2021, 49(7): 572-580.

[24] LI J, LIU J, ENDERS J, et al. Discovery of a novel deaminated metabolite of a single-stranded oligonucleotide *in vivo* by mass spectrometry[J]. Bioanalysis, 2019, 11(21): 1955-1965.

[25] LIU A W, XIAO X, WANG J W, et al. Metabolite profiling of chemically modified oligonucleotides in rat liver homogenates using hydrophilic interaction liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. Microchem J, 2024, 202: 110797.

[26] SUN Y C, NITTA S I, SAITO K, et al. Development of a bioanalytical method for an antisense therapeutic using high-resolution mass spectrometry[J]. Bioanalysis, 2020, 12(24): 1739-1756.

[27] LI X Q, ELEBRING M, DAHLÉN A, et al. *In vivo* metabolite profiles of an N-acetylgalactosamine-conjugated antisense oligonucleotide AZD8233 using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry: a cross-species comparison in animals and humans[J]. Drug Metab Dispos, 2023, 51(10): 1350-1361.

[28] KILANOWSKA A, NUCKOWSKI Ł, STUDZIŃSKA S. Studying *in vitro* metabolism of the first and second generation of antisense oligonucleotides with the use of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2020, 412(27): 7453-7467.

[29] NEEDHAM S R. Microspray and microflow liquid chromatography: the way forward for LC-MS bioanalysis[J]. Bioanalysis, 2017, 9(24): 1935-1937.

[30] JIANG D, YUAN L. Microflow LC-MS/MS to improve sensitivity for antisense oligonucleotides bioanalysis: critical role of sample cleanness[J]. Bioanalysis, 2022, 14(21): 1365-1376.

[31] GUIMARAES G J, LEACH F E, BARTLETT M G. Microflow liquid chromatography-multi-emitter nanoelectrospray mass spectrometry of oligonucleotides[J]. J Chromatogr A, 2023, 1696: 463976.

[32] DILLEN L, SIPS L, GREWAY T, et al. Quantitative analysis of imetelstat in plasma with LC-MS/MS using solid-phase or hybridization extraction[J]. Bioanalysis, 2017, 9(23): 1859-1872.

[33] LI P, GONG Y Q, KIM J, et al. Hybridization liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an alternative bioanalytical method for antisense oligonucleotide quantitation in plasma and tissue samples[J]. Anal Chem, 2020, 92(15): 10548-10559.

[34] LI P, DUPUIS J F, VRIONIS V, et al. Validation and application of hybridization liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for quantitative bioanalysis of antisense oligonucleotides[J]. Bioanalysis, 2022, 14(9): 589-601.

[35] YUAN L, DUPUIS J F, MEKHSSIAN K. A novel hybridization LC-MS/MS methodology for quantification of siRNA in plasma, CSF and tissue samples[J]. Molecules, 2023, 28(4): 1618.

[36] NGUYEN J M, GILAR M, KOSHEL B, et al. Assessing the impact of nonspecific binding on oligonucleotide bioanalysis[J]. Bioanalysis, 2021: 13(16): 1233-1244.

[37] ZHANG G D, LIN J, SRINIVASAN K, et al. Strategies for bioanalysis of an oligonucleotide class macromolecule from rat plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2007, 79(9): 3416-3424.

[38] SUN Y C, NITTA S I, SAITO K, et al. Development and multicenter validation of an LC-MS-based bioanalytical method for antisense therapeutics[J]. Bioanalysis, 2022, 14(18): 1213-1227.

[39] SIMEONE J, PATEL A V, DELANO M, et al. Optimizing test approaches for the detection of exposed metal surfaces within a chromatographic flow path[J]. J Chromatogr A, 2022, 1666: 462855.

[40] EWLES M, LEDVINA A R, POWERS B, et al. Observations from a decade of oligonucleotide bioanalysis by LC-MS[J]. Bioanalysis, 2024, 16(12): 615-629.

[41] LIU R, LUO Q, LIU Z Q, et al. Optimizing sample preparation workflow for bioanalysis of oligonucleotides through liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2020, 1629: 461473.

[42] STUDZIŃSKA S, ŁOBODZIŃSKI F, BUSZEWSKI B. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of phosphorothioate oligonucleotides in serum[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1040: 282-288.

[43] KACZMARKIEWICZ A, NUCKOWSKI Ł, STUDZIŃSKA S. Analysis of the first and second generation of antisense oligonucleotides in serum samples with the use of ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. Talanta, 2019, 196: 54-63.

[44] ANAND P, KOLETO M, KANDULA D R, et al. Novel hydrophilic-phase extraction, HILIC and high-resolution MS quantification of an RNA oligonucleotide in plasma [J]. Bioanalysis, 2022, 14(1): 47-62.

[45] MACNEILL R, HUTCHINSON T, ACHARYA V, et al. An oligonucleotide bioanalytical LC-SRM methodology entirely liberated from ion-pairing[J]. Bioanalysis, 2019, 11(12): 1157-1169.

[46] YUAN L, DUPUIS J F, VRIONIS V, et al. A validated capillary microsampling liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of antisense oligonucleotides in mouse serum[J]. Bioanalysis, 2023, 15(12): 683-694.

（收稿日期：2024-04-17　修回日期：2024-11-19）
（编辑：胡晓霖）