

合,从而使铅从组织细胞内排除,同时改善患儿的脾胃功能,促进患儿机体免疫力的提高。

总而言之,铅中毒患儿采用常规治疗联合中药排铅汤治疗的效果确切。

表 3 两组的生化指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	血铅($\mu\text{g/L}$)		血钙(mg/L)		血锌(mg/L)		血色素(g/L)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组($n=100$)	170.25 \pm 30.57	120.48 \pm 7.96 ^a	91.71 \pm 2.80	96.58 \pm 3.06 ^c	0.94 \pm 0.12	1.11 \pm 0.18 ^e	82.95 \pm 1.94	100.52 \pm 1.78 ^g
观察组($n=100$)	170.49 \pm 30.48	74.53 \pm 2.65 ^b	91.73 \pm 2.84	108.47 \pm 3.51 ^d	0.96 \pm 0.10	1.45 \pm 0.32 ^f	82.99 \pm 2.01	110.47 \pm 1.93 ^h
<i>t</i> 值	0.056	54.771	0.050	25.534	1.280	9.260	0.143	37.897
<i>P</i> 值	0.956	0.001	0.001	0.001	0.202	0.001	0.886	0.001

注:同治疗前相比较,at=15.755, bt=31.365, ct=11.741, dt=37.076, et=7.858, ft=14.615, gt=100.566, ht=98.616, 均 $P<0.05$

参 考 文 献

[1] 王治华.依地酸钙钠注射液治疗职业性铅中毒临床疗效观察[J].现代诊断与治疗,2015,26(4):832-833.
 [2] 郭理杏,肖彦凯,刘思初,等.驱铅治疗后铅中毒患者 CD3 γ 和 CD3 ϵ 链 mRNA 水平的变化[J].细胞与分子免疫学杂志,2016,32(4):508-511.
 [3] 刘岳文.依地酸钙钠与丹参注射液治疗铅中毒的疗效[J].中国卫生标准管理,20189(24):13-15.
 [4] 范旭升,李治军,齐烟台.健脾丸联合杞枣甘草汤、葡萄糖酸钙锌治疗儿童铅中毒 30 例临床分析[J].四川中医,2017,35(5):143-145.

[5] 张龔心.百令胶囊联合依地酸钙钠治疗成人慢性铅中毒肾损伤的临床效果观察[J].中国社区医师,2017,33(32):93-94.
 [6] 程美琴.中西医结合治疗职业性慢性铅中毒的临床观察[J].中国现代药物应用,2016,10(16):232-233.
 [7] 李乃妍.自拟化癥解毒汤与依地酸钙钠注射液联合治疗职业性铅中毒的疗效探析[J].中国继续医学教育,2016,8(7):197-198.
 [8] 孙志贤.用智杞颗粒对铅中毒的患儿进行排铅治疗的效果分析[J].当代医药论丛,2016,14(18):73-75.

(收稿日期:2019-04-09)
(本文编辑:卜明)

· 综述 · 讲座 ·

寡核苷酸样品制备方法的研究进展

毛强 赵春景 钱妍 邹品文

【摘要】 美国 FDA 已批准上市多种寡核苷酸用于治疗不同类型的疾病,例如治疗儿童及成人脊髓性肌肉萎缩症。寡核苷酸及其代谢物的定性和定量分析是药物开发和评估所必需的,良好的分析方法有利于控制药品质量。本文总结了寡核苷酸分析的第一步,即样品制备,特别是用于液相色谱、液相-质谱联用。需要特殊的样品制备技术需要在复杂的生物基质中确定反义寡核苷酸。本文讨论了寡核苷酸样品制备中所遇的问题及其解决方案。本文主要总结了蛋白沉淀法、酶消化法、液-液萃取法、固相萃取法及其他前瞻性技术,并突出了其与每种方法的应用相关的问题。最后,总结了实际使用的技术以及指引未来的研究方向。

【关键词】 寡核苷酸; 液相色谱; 蛋白沉淀法; 酶消化法; 液-液萃取法; 固相萃取法

[中图分类号]R524 [文献标识码]A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.16.040

Review on the study progress on sample preparation methods for oligonucleotides Qiang Mao.

Department of pharmacy, the second affiliated hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China.

【Abstract】 Multi types of oligonucleotides, approved by FDA, have been successfully applied for the treatment of different types of diseases, such as treatment of spinal muscular atrophy in children and adults. Qualitative and quantitative analysis of oligonucleotides and their metabolites are necessary for drug development and evaluation, a good analytical method is useful for controlling drug quality. This review focuses mainly on the first step of the analysis of oligonucleotides i.e. the sample preparation stage, especially for liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Exceptional sample preparation techniques are required such as antisense oligonucleotides need to be determined in complex biological matrices. The text discusses general issues in oligonucleotides sample preparation and approaches to their solution. The most popular techniques i.e. protein

precipitation, protein enzyme digestion and liquid-liquid extraction are reviewed. Solid phase extraction methods are discussed and the issues connected with the application of each method are highlighted. Other newly reported promising techniques are also described. Finally, there is a summary of actually used techniques and the indication of the direction of future research.

【Key words】 Oligonucleotides; Liquid chromatography; Protein precipitation; Enzyme digestion; Liquid-liquid extraction; Solid phase extraction

随着基因组学及精准医疗的不断发展,基于 RNA/DNA 分子的治疗药物已成为生物制药的一大类。近年来,寡核苷酸已成为各种疾病治疗的候选药物,包括乳腺癌^[1]、抗 HIV^[2]、神经系统疾病^[3] 和心血管疾病药物^[4]。目前,美国 FDA 已批准 6 个寡核苷酸^[5]; 福米韦森 (Fomivirsen) 是一种用于治疗巨细胞病毒性视网膜炎的反义寡核苷酸; 哌加他尼钠 (Pegaptanib) 是治疗新生老年性黄斑部病变的适配体; 米泊美生 (Mipomersen) 是治疗纯合子型家族性高胆固醇血症的硫代磷酸寡核苷酸; Exondys 51 (Eteplirsen) 是一种靶向 51 号外显子的磷酸吗啉寡核苷酸,用于治疗杜氏肌营养不良症; 去纤维维纳 (Defibrotide) 用于有肝小静脉闭塞病,造血干细胞移植后有肾或肺功能失调成年和儿童患者的治疗; Spinraza (Nusinersen) 用于治疗儿童及成人脊髓性肌肉萎缩症的反义核苷酸药物。此外,许多 DNA 适配体、反义药物以及小干扰 RNA (siRNA) 治疗已经或正在实施临床试验。

我国是仿制药大国,但仿制药的质量参差不齐,其严重影响了广大患者的用药安全。因此,精确、高效、稳定的定量方法对检测各类体液中的此类寡核苷酸及其代谢物,研究其药代动力学和药效学以及未来患者的护理至关重要^[6]。合适的样品提取方法对后续的样品分析至关重要,常见的寡核苷酸提取方法有蛋白质沉淀法 (PP)、蛋白酶 K 消化法、液-液萃取 (LLE) 和固相萃取法 (SPE)。虽然测定寡核苷酸及其代谢物的分析方法有很多,但是缺少对这类样品分析样品制备技术的总结。本综述的目的是概述用于 LC 和 LC-MS 分析的样品制备技术。

一、寡核苷酸概述

寡核苷酸 (Oligonucleotides, OGNs) 是一种单链短核酸分子,通常由 19~27 个核苷酸组成,其分子量为 5~14 kDa,含有多个负电荷^[7]。这类药物的临床应用研究始于大约 30 年前,包括了反义寡核苷酸、核酸适配体及近 15 年来对各类 siRNAs 的研究^[5]。这类药物的作用机制是其被导入人体细胞内,通过阻止了 mRNA 分子的翻译,而抑制或阻止相应蛋白质的合成^[8]。常见的寡核苷酸分为两类,一类是天然的 (未经修饰的),另一类是修饰的。天然的寡核苷酸易被核酸酶降解、对检测 DNA 或 RNA 链没有足够的结合亲和力^[9]。另一个缺点是穿透细胞膜的渗透性低、生物利用度低。因此,为了提高其在生物基质 (血浆、组织和细胞) 中的稳定性,需对其进行结构修饰。此外,修饰后寡核苷酸的还能防止其被机体内或体外的酶降解,从而增加其对 RNN 链的特异性结合并降低其毒性。寡核苷酸的修饰有三种,即对其结构总的磷酸基团、糖基、碱基进行修饰。但是不同的修饰展现出不同物理化学性质,药物开发时往往根据我们的研究目的进行一种或多种组合修饰,以开发出稳定性、特异性和靶向性都好的寡核苷酸。

二、寡核苷酸的定量分析方法

定量各种基质中的寡核苷酸主要有以下几种方法: RT-qPCR、LC-荧光、LC-MS、LC-HRAM。但是这些方法都有一

定的优点和局限性^[10-12]。通常情况下,RT-qPCR 主要用于内源性 microRNA、siRNA 和 lncRNA 定量;对于修饰后的寡核苷酸药物,如果灵敏度满足分析需要,则首选 LC-MS 分析方法,但如果需分析鉴定及定量未知代谢物的浓度则选择 Q-Exactive 系列的 LC-HRMS。如果灵敏度和特异性都很重要且在 LC 可以充分分离寡核苷酸与其主要代谢物条件下,则选择 LC-荧光分析法。但是,由于 LC-FL 分析法需要设计特殊的引物或探针、单个药品分析时间长不利于大批量样本分析,不能特异性测量寡核苷酸代谢物,而 LC-MS 和 LC-HRMS 分析法就又具有特异性好、精密度和准确度高、重现性好、线性范围宽、高通量、可进行靶向或全扫描,可以同时定量和监测多个寡核苷酸 (包括代谢物)。因此,本综述重点介绍 LC 或 LC-MS 分析寡核苷酸的样品制备技术。

三、寡核苷酸样品制备中的一些问题

从生物基质中提取样品是生物分析技术的第一步,该步骤必须能有效地去除样品 (血液、血浆、尿液和组织) 中的干扰化合物并浓缩寡核苷酸。良好的样品制备方法必须操作简单并且分析物回收率高,同时能够消除所有干扰物。所有其他非分析的化合物都可能在 MS 检测中引起基质效应。寡核苷酸制剂含多种辅料,包含盐、有机和无机成分等,这些物质可以干扰其分析与检测。因此,在样品制备过程中常通过加入蛋白酶、促溶盐、洗涤剂等使与血浆蛋白结合的寡核苷酸游离出来。此外,寡核苷酸带负电荷,其可吸附在带正电荷的玻璃和塑料容器、移液管、进样针和色谱柱等。如果想要分析物回收率高,则需要减少样品转移次数并避免非特异性结合,例如使用硅烷化玻璃试管、加入高浓度的内标,使用不含 RNA 酶的试剂和耗材以减少寡核苷酸的降解或损失。

四、寡核苷酸的样品制备方法

1. 蛋白沉淀法: 蛋白沉淀法是最简单的寡核苷酸样品制备技术,通常以醋酸铵、甲醇或乙腈蛋白沉淀剂。有研究人员以乙腈作为沉淀剂萃取硫代磷酸酯反义寡核苷酸,由于此时其同蛋白一同沉淀而导致质谱未检测到该分析物。随后,其先用乙醇沉淀反义寡核苷酸,然后用 20% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和乙酸铵裂解沉淀物中蛋白并将蛋白中的分析物释放到水相中,经分析发现此时的样品回收率只有 16%^[13]。但是, Ahmad 等在利用 LC-MS/MS 分析抗 Raf-1 表达的反义寡核苷酸时,发现用蛋白沉淀法制备小鼠组织样品 (心脏、肾、肝、肺和脾) 比采用固相萃取法制备的样品回收率要高,此外,还发现乙腈是比甲醇更适合做沉淀剂,如果在乙腈中加入 0.1% 的三乙胺,则寡核苷酸峰面积将增加 2~3 倍^[14]。因此,蛋白沉淀法可用于提取寡核苷酸的组织样品,但由于样品制备过程中寡核苷酸会结合蛋白并同其一同沉淀,从而致使寡核苷酸回收率下降,此外,蛋白沉淀法方法可显著抑制 ESI-MS 检测中的寡核苷酸电离,降低检测灵敏度。通常,蛋白沉淀法的回收率还取决于寡核苷酸序列的大小或长度。

2. 酶消化法: 酶消化法主要用蛋白酶 K 将蛋白水解为氨基酸,以去除生物样品中结合的蛋白。此方法,常用于 LC-荧

光分析法中^[12],首先,移取 25 μl 样品(包括标准曲线样品、质控样品、试验样品)至 200 μl 的 96 孔 PCR 板,移取空白基质 25 μl 作为空白样品。其次,向所有样品均加入 200 μl 蛋白裂解液(含一定量的蛋白酶 K),在 PCR 仪上于 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 分钟后,向其加入 PBS/lysis mixture,离心后取 150 μl 上清于新的 PCR 板并加入 40 μl PNAprobe 溶液与于 PCR 仪上 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 分钟。最后,将样品于冰上放置 20 分钟后,siRNA 经 LC-荧光分析得其检测线为 1~1 000 ng/mL,但此文未做回收率评估。Gallo 等用加有蛋白酶 K 的组织细胞裂解液将组织(肾脏、肌肉、心脏和脑组织)裂解并消化,然后用苯酚/氯仿(50:50, v/v)进行液-液萃取硫代磷酸酯寡聚核苷酸(20 个核苷酸),最后用 HPLC-UV 对样品进行分析,该方法回收率为 50%~85%^[15]。虽然酶解法中可以通过向蛋白酶 K 溶液中添加某些化合物(EDTA、DTT、Triton X-100)而提高回收率至 95%^[16]。这是因为 EDTA 可通过络合金属离子而抑制 RNase 活性,而不影响蛋白酶 K 活性。DTT 可通过破坏核糖核酸酶结构中的多个二硫键来降低核糖核酸酶 A 的活性。Tris 溶液达到的最佳 pH 值影响分解裂解缓冲液的组成。非离子表面活性剂 Triton X-100 可促进细胞溶解,而盐酸胍用作变性剂,可减少蛋白酶 K 用量和减少消化时间。然而,此方法不仅耗时,不能让组织样品充分裂解以释放组织中分布的寡聚核苷酸,也未能去除任何其他干扰化合物。因此,酶解法不利于临床前和临床研究的寡核苷酸分析。

3.液-液萃取法:液-液萃取法是生物分析中常用的样品提取方法,使两种不混溶的液体相互接触,从而影响一种或多种溶质从一种液相转移到另一种液相。常用的有机溶剂有甲基叔丁基醚、乙酸乙酯、正己烷和 1-氯丁烷、苯酚/氯仿或在苯酚/氯仿中加入少量异戊醇(<5%)^[17]。通常,水溶性化合物用不溶于水的溶剂提取,也会向溶剂中加入一定浓度的弱酸、苯酚/氯仿,这是因为其可增加蛋白质变性和沉淀,将血浆蛋白结合的寡聚核苷酸游离并释放到水相。

据研究报道,液-液萃取方法的回收率约 80%~90%^[18]。回收率的高低不仅取决于苯酚/氯仿萃取过程中添加的其他溶剂,还需要一些额外的清洗步骤。水相通常含有苯酚的残留物,可能影响色谱分析。因此,液-液萃取提取方法通常会结合与其他技术,如酶消化或固相萃取,有时液-液萃取只是复杂提取过程中的一个步骤。样品制备时,综合多种提取方法可彻底去除寡聚核苷酸中的干扰物,但每增加一个除杂质步骤都可能导致回收率下降。Turnbpenny 等用液-液萃取法提取小鼠组织中的反义寡核苷酸时,除使用呢苯酚/氯仿溶液外,还用了氨水、二氯乙烷、DNP(4-(4-二氨基苯基偶氮)-1-(4-硝基苯基)-溴化吡啶)。这是因为二氯乙烷可去除残留的苯酚溶液,氨水缓冲液让分析物保持电离,DNP 有助于不同液相分层及组织样本中的酸进入有机层。样品经 LC-MS/MS 定量发现小鼠血浆中的回收率为(89 \pm 2)% ,肝、肾组织中的回收率为(92 \pm 5)%^[19-20]。因此可以得出结论,此方法适用于提取血清和组织样本中的寡核苷酸。

4.固相萃取法:固相萃取法是通过在固相(吸附剂)和液相(溶剂)之间选择性地分离或去除混合物中的分析物。该方法用于从液态生物和环境基质中提取和浓缩待测物。最常见的 SPE 柱或 96 孔板为:Waters Oasis HLB、Clarity OTX 产品。Waters Oasis HLB 是一种反相聚合吸附剂,二乙烯基苯-co-n-乙烷基吡咯烷酮,而 Clarity OTX 的 SPE 柱是弱的阴离

子交换(WAX)吸附剂。其他用于提取寡聚核苷酸的 SPE 方法采用强阴离子交换(SAX)二乙氨基乙基-纤维素(DEAE)、烷基链(C2、C18)和苯基结合的二氧化硅吸附剂。以 Oasis HLB 产品为例,其通常适用于萃取反义寡聚核苷酸。固相萃取的主要步骤为依次用乙腈、去离子水、离子对试剂溶液对 SPE 柱进行预处理,加样,然后依次用离子对试剂溶液洗涤并去除蛋白质和盐,再用含离子对试剂的甲醇溶液洗褪分析物。真空干燥后的残留物用流动相复溶以备 LC-MS 分析^[21]。

一般来说,寡核苷酸的回收率取决于其本身的化学性质和固相萃取中使用的离子对试剂、溶液 pH、洗脱液的组成。相关文献报道,Waters Oasis HLB、Clarity OTX WAX SPE cartridge,SAX SP 的回收率分别约 20%~96%、约 55%~99%、约 90%^[18]。离子对溶液的 pH 影响着寡聚核苷酸的提取效率。当 pH 值低于 7 时,由于缺乏离子化作用,寡核苷酸的回收率很低。随着 pH 值的升高,寡聚核苷酸逐渐电离并被提取。在 pH~11 时观察到最大回收率。必须指出,在较高的 pH 值下,寡聚核苷酸可以降解。萃取洗脱液的高 pH 值消除了 SPE 柱上硅基固相,但聚合物吸附剂仍然有用。回收率也受 IPR 浓度的影响,较高浓度的有机溶剂降低了寡聚核苷酸的溶解度,降低了洗脱能力。

不同的吸附剂对于不同的生物基质是不同的。萃取回收率的绝对值取决于寡聚核苷酸的修饰。固相萃取法与其他样品制备技术的差异最大。它可以作为一种单一的技术,并与其他技术结合使用。如果仔细优化了 SPE 程序,它可能提供更高的回收率。因此,这项技术提供了良好的寡聚核苷酸提取方法,但包含了许多步骤,而且非常耗时。此外,必须指出,在固相萃取过程中使用的某些试剂会抑制质谱信号而不能用于 LC-MS 分析。使用 MS 兼容试剂很重要,例如 IPR 模式的胺-HFIP(六氟异丙醇)混合物,或 SPE 阴离子交换模式的乙酸铵和甲酸铵。

5.其他前瞻性技术:最近,有研究人员研发了一些新的寡核苷酸提取方法,即使用反胶束对单链 DNA 和 RNA 寡核苷酸进行液液萃取。反胶束是有机溶剂中的一种纳米级水滴,可通过一层表面活性剂分子对物质进行分离,其可将水相中的水溶性化合物提取至有机溶剂中。该表面活性剂通常与提取的寡核苷酸的疏水性油酰基和亲水性核酸链互补。在高温下加入 2-丁醇可以很容易地反萃取出寡核苷酸。利用此方法提取 DNA 和 RNA 寡核苷酸的回收率分别约 50% 和 80%^[22]。

磁离子液体(MILs)是一类特殊的离子液体,常用于化学领域(包括分析和生命科学),除了具备典型的离子液体特性外,还表现出对外部磁场的强磁化率。Anderson 等发现不同磁离子液体对不同分析物的萃取效率不同,这使定制个体化磁离子液体以提高选择性成为可能。从磁离子液体提取相中回收 DNA,即将其溶解在醋酸钾溶液中,用硅胶吸附剂进行简单地纯化,乙醇沉淀 DNA,此方法的回收率为(57 \pm 6)%^[23]。

五、样品提取后处理

提取后的样品几乎都要经过样品浓缩步骤,通常包括真空干燥。然而,真空干燥通常在高温下进行,这既可能造成样品损失,又可能使样品氧化而在色谱上产生其他的色谱峰。我们可以通过“近干”替代“全干”而避免这种影响,也可以通过氮气让样品部分吹干,还可以向试剂中加入 TCEP(一种

MS 相容的抗氧化剂)。

利用化学修饰的寡核苷酸进行治疗已进入临床前研究或临床研究的各个阶段。药物开发需要使用准确、有效、稳定的定性和定量方法来测定寡核苷酸及其代谢物。目前,寡核苷酸的常见生物分析方法有 LC-FL(荧光)、LC-MS/MS、LC-HR/AM,而这些分析方法都需要进行样品制备。

在进行寡核苷酸临床前研究和药代动力学研究时,生物样品可能来自动物血浆、肝脏、肾脏、心脏及人体血浆、血清和脑脊液。由于这些生物基质组成复杂或含有大量的干扰物,因此,为了去除这些杂志或干扰物,我们可能采用蛋白沉淀法、酶解法、液-液萃取和固相萃取法中的一种或多种来纯化及提取样品。此外,本文还提及了一些前瞻性技术,拓展了寡核苷酸样品制备技术。所有这些技术独自运用通常表现出较低的分析物回收率,因此,它们主要适用于定性分析。但是,如果样品萃取步骤以复杂的方式开发和优化,综合利用多种技术的组合可能提高回收率,例如样品经过沉淀后,在进行液液萃取,即用苯酚/氯仿/异丙醇(25:24:1 v/v/v)萃取寡核苷酸,此时苯酚使蛋白变性、寡核苷酸进入水相中,然后将水相中转至新的管子和 96 孔板中,然后用二氯甲烷除去残留的苯酚(苯酚会影响色谱峰)。如果是组织样品,由于基质更加复杂,我们可以在此基础上再进行一次固相萃取,以进一步纯化和浓缩样品,减少基质效应并提高检测灵敏度。本文仅描述了萃取方法对样品提取回收率的影响。然而,目前对于用于分析寡核苷酸药物或制剂样品制备进行全面、系统的研究仍然存在。

今后的研究应该集中在改进样品制备方法上。到目前为止,为了提高寡核苷酸的回收率而采用的制备技术。采用新的固定相进行固相萃取改性可以提高萃取效率。此外,其他用于不同分析物的生物分析的新技术必须在寡核苷酸提取中进行测试。这项任务的一个重要方面是减少样品制备程序。新技术的一个重要特点是过程的小型化和自动化,甚至与 LC 系统的在线耦合。一般来说,方法验证时不一定非得保证回收率高,只要精度和准确度符合要求,回收率一致,可以达到定量限即可。

参 考 文 献

- [1] Wu X, Shaikh AB, Yu Y, et al. Potential Diagnostic and Therapeutic Applications of Oligonucleotide Aptamers in Breast Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): E1851.
- [2] Bala J, Chinnapaiyan S, Dutta RK, et al. Aptamers in HIV research diagnosis and therapy[J]. RNA Biol, 2018, 15(3): 327-337.
- [3] Rinaldi C, Wood MJA. Antisense oligonucleotides; the next frontier for treatment of neurological disorders[J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14(1): 9-21.
- [4] Hang P, Guo J, Sun C, et al. MicroRNAs as Candidate Drug Targets for Cardiovascular Diseases [J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(4): 463-472.
- [5] Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017[J]. Mol Ther, 2017, 25(5): 1069-1075.
- [6] Wang L, Ji C. Advances in quantitative bioanalysis of oligonucleotide biomarkers and therapeutics [J]. Bioanalysis, 2016, 8(2): 143-155.
- [7] McGinnis AC, Chen B, Bartlett MG. Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2012, 883-884: 76-94.
- [8] Wurster CD, Ludolph AC. Antisense oligonucleotides in

neurological disorders [J]. Ther Adv Neurol Disord, 2018, 11: 1756286418776932.

- [9] Kaczmarkiewicz A, Nuckowski Ł, Studzińska S, et al. Analysis of Antisense Oligonucleotides and Their Metabolites with the Use of Ion Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry [J]. Crit Rev Anal Chem, 2019, 49(3): 256-270.
- [10] Sturm RM, Jones BR, Mulvana DE, et al. HRMS using a Q-Exactive series mass spectrometer for regulated quantitative bioanalysis; how, when, and why to implement [J]. Bioanalysis, 2016, 8(16): 1709-1721.
- [11] Wang L. Oligonucleotide bioanalysis; sensitivity versus specificity [J]. Bioanalysis, 2011, 3(12): 1299-1303.
- [12] Tian Q, 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.
- [13] Studzińska S, Rola R, Buszewski B. Development of a method based on ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry for studying the in vitro metabolism of phosphorothioate oligonucleotides [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(6): 1585-1595.
- [14] Johnson JL, Guo W, Zang J, et al. Quantification of raf antisense oligonucleotide (rafaON) in biological matrices by LC-MS/MS to support pharmacokinetics of a liposome-entrapped rafaON formulation [J]. Biomed Chromatogr, 2005, 19(4): 272-278.
- [15] Chen SH, Qian M, Brennan JM, et al. Determination of antisense phosphorothioate oligonucleotides and catabolites in biological fluids and tissue extracts using anion-exchange high-performance liquid chromatography and capillary gel electrophoresis [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 692(1): 43-51.
- [16] McGinnis AC, Cummings BS, Bartlett MG. Ion exchange liquid chromatography method for the direct determination of small ribonucleic acids [J]. Anal Chim Acta, 2013, 799: 57-67.
- [17] 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.
- [18] Nuckowski Ł, Kaczmarkiewicz A, Studzińska S. Review on sample preparation methods for oligonucleotides analysis by liquid chromatography [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2018, 1090: 90-100.
- [19] Chen B, Bartlett MG. Evaluation of mobile phase composition for enhancing sensitivity of targeted quantification of oligonucleotides using ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry: application to phosphorothioate deoxyribonucleic acid [J]. J Chromatogr A, 2013, 1288: 73-81.
- [20] Turmpenny P, Rawal J, Schardt T, et al. Quantitation of locked nucleic acid antisense oligonucleotides in mouse tissue using a liquid-liquid extraction LC-MS/MS analytical approach [J]. Bioanalysis, 2011, 3(17): 1911-1921.
- [21] 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.
- [22] Maruyama T, Ishizu N, Eguchi Y, et al. Liquid-liquid extraction of enzymatically synthesized functional RNA oligonucleotides using reverse micelles with a DNA-surfactant [J]. Chem Commun (Camb), 2016, 52(83): 12376-12379.
- [23] Clark KD, Nacham O, Yu H, et al. Extraction of DNA by magnetic ionic liquids; tunable solvents for rapid and selective DNA analysis [J]. Anal Chem, 2015, 87(3): 1552-1559.

(收稿日期: 2019-03-25)

(本文编辑: 李林)