

辅助生殖培养液中庆大霉素临床前安全评价思考

管瑞芹^{1,2}, 王召旭², 姜爱莉^{1*}, 柯林楠^{2*} (1. 烟台大学, 烟台 264005; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的: 归纳总结庆大霉素对配子和胚胎的影响, 并对辅助生殖培养液临床前评价需要考虑的问题进行分析, 为辅助生殖培养液产品中庆大霉素的临床前安全评价提供参考。方法: 以辅助生殖培养液中添加的药物庆大霉素为研究对象, 结合庆大霉素在产品中的应用, 采用文献调研法总结归纳了庆大霉素对生殖细胞、胚胎以及胚胎干细胞产生的影响, 并根据辅助生殖用液产品监管现状, 提出临床前安全评价思考。结果与结论: 庆大霉素被广泛应用在辅助生殖培养液中, 安全、规范地使用庆大霉素在辅助生殖技术中具有重要意义。目前有关庆大霉素对配子及胚胎毒性的研究较少, 已知的结论都是基于鼠胚试验及其他动物试验得出的结果扩展到人类胚胎, 有必要关注庆大霉素对人类配子及胚胎发育的影响。其次, 对于辅助生殖用液产品中庆大霉素添加量的确定、原料质量控制以及检测方法等方面存在的问题提出有针对性的建议, 为加强辅助生殖用液的质量控制和产业监管提供思路, 从而促进辅助生殖技术的发展。

关键词: 人类辅助生殖技术; 培养用液; 庆大霉素; 配子; 胚胎; 临床前评价; 质量监管

中图分类号: R95; R912 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)12-1377-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.12.007

Consideration on Preclinical Safety Evaluation of Gentamicin in Assisted Reproductive Culture Medium

Guan Ruiqin^{1,2}, Wang Zhaoxu², Jiang Aili^{1*}, Ke Linnan^{2*} (1. Yantai University, Yantai 264005, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To summarize the effects of gentamicin on gametes and embryos, and analyze the problems needed to be considered in the preclinical evaluation of gentamicin in liquid products for assisted reproductive culture, so as to provide references for the preclinical safety evaluation of gentamicin in assisted reproductive culture liquid products. **Methods:** The drug gentamicin added in the assisted reproductive culture medium was taken as the research object, combined with application of gentamicin in the product, the effects of gentamicin on germ cells, embryo and embryonic stem cells were summarized by literature research method, according to regulatory status of liquid products for assisted reproduction, preclinical safety evaluation thinking was put forward. **Results and Conclusion:** Gentamicin is widely used in assisted reproductive culture medium. Safe and standard use of gentamicin is of great significance in assisted reproductive technology. At present, there are few studies on the toxicity of gentamicin to gametes and embryos. The known conclusions are based on

基金项目: 国家重点研发计划 (编号 2020YFC1107901)

作者简介: 管瑞芹 Tel: 18364176101; E-mail: guanguan9510@163.com

通信作者: 柯林楠 Tel: (010) 53852572; E-mail: kelinnan@sina.com

姜爱莉 Tel: 13963806973; E-mail: jal9035@163.com

the results of mouse embryo test and other animal tests and extended to human embryos. It is necessary to pay attention to the effects of gentamicin on human gametes and embryos development. Secondly, for the problems in the determination of gentamicin dosage, quality control of raw materials and detection methods in assisted reproductive liquid products, targeted suggestions were put forward to provide ideas for strengthening the quality control and industrial supervision of assisted reproductive liquid products, so as to promote the development of assisted reproductive technology.

Keywords: assisted reproductive technology; culture media; gentamicin; gamete; embryo; preclinical evaluation; quality supervision

近年来,由于环境污染、育龄人群患癌年轻化等问题的出现,全球人类生育力水平呈持续衰减状态。中国育龄夫妇的不孕不育率从20年前的2.5%~3%攀升到12.5%~15%左右,约20%的患者需要通过辅助生殖技术(Assisted Reproductive Technology, ART)来治疗^[1]。人类体外辅助生殖技术已成为越来越多不孕症患者的选择。

ART包括人工授精(Artificial Insemination, AI)和体外受精-胚胎移植(In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, IVF-ET)及其衍生技术两大类。在ART中需要用到很多辅助生殖产品,其中ART用液是指与人类配子和胚胎发生直接或间接接触,用以准备、培养、转移或储存人类配子和胚胎的液体类医疗器械产品^[2]。ART用液为配子、合子和早期胚胎发育提供了必要的能量物质和营养成分,其基本成分包括碳水化合物、氨基酸、血清白蛋白、无机盐、维生素、生长因子、抗生素等^[3],在ART的不同阶段需要根据各阶段的需求选择适合的培养用液。

体外胚胎培养的各个环节包括患者的精液和卵泡液所携带的细菌、培养体系及环境等均有可能造成微生物污染^[4],尽管污染现象很少见,但却是很严重的问题^[5],它会导致受精率下降,甚至影响胚胎的生长和发育^[6-8]。为防止辅助生殖过程中出现微生物污染,通常会在培养用液中添加抗生素,常用的如青霉素、链霉素及庆大霉素等。抗生素在选择上应充分考虑其性质及安全性,如抗生素的稳定性、与培养用液中其他成分的相互作用、对微生物起作用的浓度是否会对配子及胚胎产生影响等。青霉素、链霉素生物半衰期较短,会引起过敏反应。庆大霉素对温度变化较稳定,在37℃时能保持活性长达2周,且在较宽的pH范围内稳定性好,在

碱性环境中抗菌活性增强^[9]。因此,目前商品化的ART培养用液多选用庆大霉素作为抗菌药物^[10]。

ART用液中添加庆大霉素能抑制细菌生长繁殖、降低细菌污染带来的危害,但是庆大霉素是否会对配子、受精卵及胚胎带来风险仍未知。ART用液类产品在我国被作为三类医疗器械进行管理,由于它直接作用于人类配子和胚胎,对此类产品的质量控制在普通医疗器械更为严格。本文综述了庆大霉素对配子和胚胎的影响,对其临床前评价需要考虑的问题进行分析,为ART用液产品中庆大霉素的临床前安全评价提供参考。

1 庆大霉素概述

1963年,Weinstein等^[11]从小单孢菌属的代谢物中分离出庆大霉素。1966年,我国著名微生物学家王岳等研究者成功从小单孢菌中分离出庆大霉素,并在1969年正式投产。庆大霉素属于氨基糖苷类抗生素,其结构由2-脱氧链霉胺(2-Deoxystreptamine)通过糖苷键在其C-4与C-6位上与加拉糖胺(Garosamine)和绛红糖胺(Purpurosamine)连接形成。临床上使用的庆大霉素主要由C1、C1a、C2、C2a和C2b 5种组分组成^[12],这5种组分结构上的差异主要表现在绛红糖胺C-6位上的甲基化程度不同。甲基化影响庆大霉素的抗菌活性,其中抗菌活性最高的是C1a^[13],但C1a毒性较大且容易产生耐药性;C1毒副作用较小、不易产生耐药性,但治疗效果低于C2和C1a;C2、C1a组分活性高,但C2的毒性大且易产生耐药性^[14]。庆大霉素对革兰氏阴性菌具有很强的抑制作用,它通过与靶细胞内核糖体30S亚基16S rRNA上的氨酰基位点结合,引起mRNA错译或者翻译终止,从而干扰细菌蛋白质的合成,引起细菌死亡^[15]。庆大霉素具有广谱抗菌性,被广泛应用在感染严

重的临床治疗中。其治疗指数较窄导致它的使用是有风险的, 已知的庆大霉素毒性包括耳毒性^[16]、肾毒性^[17]、且肾清除能力差等副作用。

2 庆大霉素对配子及胚胎的影响

目前, 有关庆大霉素在体外辅助生殖过程中对配子、植入前阶段胚胎发育影响的研究较少, 但是通过文献查阅, 发现庆大霉素可能会存在一些不良影响。

Jasko等^[18]收集马精子进行实验, 研究发现庆大霉素对精子活力产生负面影响。精液稀释液中添加2000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素并在5 $^{\circ}\text{C}$ 下储存24 h后, 精子活力和前向运动的精子百分比下降; 在5 $^{\circ}\text{C}$ 下储存48 h, 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素也会导致精子活力和前向运动的精子百分比下降。Aurich等^[19]通过测试精子活力参数, 发现在不添加细菌的情况下, 向精液稀释液中添加庆大霉素会导致精子的运动参数(活力、平均速度、曲线速度、直线速度等)降低, 说明庆大霉素会导致精液质量下降。此外, Anel-lopez等^[20]在实验中比较了庆大霉素、林可霉素-壮观霉素、青霉素-链霉素几种抗生素对冷冻解冻后公羊精子质量的影响, 结果显示, 庆大霉素具有极好的抗菌作用, 但是当精液稀释液中添加1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素时, 对精子质量产生了毒性影响。

Zhou等^[21]分别研究了不添加抗生素和使用庆大霉素的体外培养液中, 仓鼠原核卵子均发育良好, 并认为在能保证无菌和使用油覆盖的情况下, 胚胎培养液中不必添加抗生素。Han等^[22]评估了庆大霉素对小鼠受精卵发育和单个囊胚的全基因表达谱的影响。研究表明, 受精卵发育到形态正常囊胚的速度呈庆大霉素剂量依赖性延迟, 同时伴随着囊胚内细胞数量的减少。胚胎培养液中添加的抗生素导致大量基因表达下调, 可能会损害所产生胚胎的基因组完整性。

Biernacki等^[23]采用植入后大鼠体外全胚胎培养研究庆大霉素胚胎毒性, 结果显示100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素会略微影响鼠胚胎生长和发育, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素导致胚胎发育略微延迟, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素均会导致胚胎出现血肿^[23]。另外, 有研究表明庆大霉素影响胚胎干细胞的分化。Cohen等^[24]研究了庆大霉素对小鼠胚胎干细胞向II型肺泡细胞分化的影响。II型肺细胞

表面活性蛋白C (Surfactant Protein C, SPC) mRNA的水平可作为小鼠胚胎干细胞向肺泡II型肺泡上皮细胞分化程度的一个指标, 实验发现, 庆大霉素(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)显著降低了SPC mRNA的表达, 说明庆大霉素能够降低胚胎干细胞的分化潜能。Varghese等^[25]评价了氨基糖苷类抗生素例如不同浓度的庆大霉素(0、10、25、50和200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对人胚胎干细胞存活和分化的影响。研究者观察到与未处理的对照组相比, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素单独使用或与青霉素-链霉素合用对人胚胎干细胞的存活率、菌落形成效率、多能性标记物(Oct4、Sox2和Nanog)没有影响, 虽然庆大霉素对人胚胎干细胞向内皮细胞分化无影响, 但是胚胎干细胞在定向分化为神经和肝脏细胞的过程中, 出现细胞死亡, 并且神经前体标志物(Pax6、Emx2、Otx2和Pou3f2)的表达显著降低。因此, 庆大霉素可能影响胚胎早期神经发育。

3 ART用液中庆大霉素的监管现状及建议

30多年来, 我国辅助生殖技术发展迅速, 在巨大的市场需求下, ART用液需求量逐渐增加。为了加强ART用液管理, 国家药品监督管理局于2018年4月发布了《人类体外辅助生殖技术用液注册技术审查指导原则》。此外, 还发布实施了《人类辅助生殖技术用医疗器械培养用液中氨基酸检测方法》等行业标准。但是, 由于ART用液成分较多, 仍然缺乏其他成分相关的国家标准和行业标准。庆大霉素作为辅助药物添加在ART用液中, 对于配子及胚胎毒性评估、添加量、原料质量控制以及检测方法尚未有统一的标准来规范, 下面将从这些方面提出一些思考和建议。

3.1 配子及胚胎毒性评估

庆大霉素在临床中会出现肾毒性、耳毒性等不良影响, 研究人员对此有大量深入的研究, 但是庆大霉素对配子和胚胎的影响研究报道很少。全球第一例试管婴儿从出生到现在仅40多年, 很多ART方面的数据包括庆大霉素使用浓度等都是基于鼠胚试验和其他物种试验结果扩展到人类胚胎。庆大霉素作为营养成分添加至ART培养液中, 用于防止微生物污染, 对生殖细胞、孕妇、甚至子代健康的影响尚未研究完全。有研究^[26-27]报道, 抗生素会影响细胞的基因表达和调控, 为了保证ART培养液产品使用安全, 有必要从分子、基因水平上系统

地研究庆大霉素的安全性以及对人类远期的影响。

3.2 庆大霉素添加量的控制

庆大霉素的不良反应与剂量和暴露时间直接相关。根据《抗菌药物临床应用指导原则(2015年版)》^[28]中氨基糖苷类抗生素的注意事项,新生儿和妊娠期患者应避免使用此类抗菌药物,即使在使用时也应应对患者进行血药浓度监测。

鉴于氨基糖苷类抗生素对母体和胎儿均有毒性作用,且对胚胎的潜在风险未知,建议ART用液中应谨慎添加庆大霉素。精子密度梯度分离液,主要用于精子的收集和准备,在辅助生殖过程中虽然与精子密切接触,但时间较短,目前国外企业该类产品中一般不添加庆大霉素。另外,通过有效的控制手段,例如预防性抗生素治疗、ART用液无菌状态提供、在培养系统中保持无菌等,最大限度地降低微生物污染,尽量减少在ART用液中抗生素的使用,将庆大霉素毒性副作用的风险降至最低。

3.3 原料的质量控制

庆大霉素是以C组分为主的多组分混合物,不同组分之间抗菌活性、毒性和耐药性不同。其中,抗菌活性高的组分,毒性大、易产生耐药性;而毒性小、不易产生耐药性的组分,抗菌活性低^[14]。2020年版《中华人民共和国药典》中规定了硫酸庆大霉素C组分的上下限和4个组分总含量要求^[29]。为了保证该类产品全生命周期质量安全,应关注对庆大霉素原料的控制及不同组分对配子及胚胎的风险。

3.4 建立有效的检测方法

2018年,国家药品监督管理局发布《人类体外辅助生殖技术用液注册技术审查指导原则》,其中“建议制定除保持pH值和渗透压为目的以外的所有成分定量要求和检测方法并检测”^[1]。庆大霉素极性高,缺乏紫外吸收的发色团且不易挥发。其检测方法主要有紫外分光光度法^[30-31]、HPLC蒸发光散射法^[32-33]、HPLC电喷雾检测法^[34-35]、质谱法^[36-37]、高效液相色谱-飞行时间质谱法^[38-39]、酶联免疫^[40]等。由于ART用液中成分复杂,基质存在干扰,药典目前收录的庆大霉素测试方法不适用于ART用液,有必要针对ART用液中庆大霉素含量测定建立适宜的前处理方法和分析技术。

4 结语

辅助生殖用液直接作用于人类生殖细胞,在

我国被归为三类高风险医疗器械,产品质量关系到辅助生殖技术的成功与否,母代及子代的健康,决定了人口素质,因此必须严格控制其质量。

面对“提高优生优育服务水平”的国家战略需求、辅助生殖用医疗器械巨大的临床需求,以及大量国产自主研发产品的市场化需求,急需建立相关产品质量标准和检验方法标准。同时,应严格审核和评估加入的抗生素,特别是庆大霉素的风险收益比,加强相关检测技术的研究与开发。

参考文献:

- [1] 韩倩倩,季煦,常露,等.人类辅助生殖技术用液类产品生产用水的胚胎毒性研究[J].中国医疗器械杂志,2020,44(5):439-442.
- [2] 国家药品监督管理局.人类体外辅助生殖技术用液注册技术审查指导原则[EB/OL].(2018-04-25)[2022-02-24].<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20180426172301719.html>.
- [3] Metha RH. Growth of Human Preimplantation Embryos in Vitro[J]. Reprod Biomed Online, 2001, 2(2): 113-119.
- [4] Borges ED, Berteli TS, Reis TF, et al. Microbial Contamination in Assisted Reproductive Technology: Source, Prevalence, and Cost[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2020, 37(1): 53-61.
- [5] Lin LL, Guu HF, Yi YC, et al. Contamination of ART Culture Media—The Role of Semen and Strategies for Prevention[J]. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology, 2021, (60): 523-525.
- [6] 周文静,冯颖,王慧红,等.细菌污染对小鼠胚胎发育的影响[J].生殖医学杂志,2014,23(7):583-586.
- [7] Zarutskie PW, Dixon LL, Hiller SL. Identifying Sources of Bacterial Endotoxin Contamination in an in Vitro Fertilization (IVF) Culture Environment[J]. J Assist Reprod Genet, 1992, 9(1): 77-80.
- [8] Pelzer ES, Allan JA. The Isolation and Identification of Microorganisms in the Reproductive Environment: the Potential Impact on the IVF Culture System and on IVF Outcomes[J]. J Clin Embryol, 2012, 15(3): 44-53.
- [9] 诸玲玲,孟现民,张永信.氨基糖苷类药物的发展历程[J].上海医药,2011,32(7):322-326.
- [10] Schafer TW, Pascale A, Shimonaski G, et al. Evaluation

- of Gentamicin for Use in Virology and Tissue Culture[J]. *Applied Microbiology*, 1972, 23: 565–570.
- [11] Weinstein MJ, Luedemann GM, Oden EM, et al. Gentamicin, a new Antibiotic Complex form *Micromonospora*[J]. *J Med Chem*, 1963, 6: 463–464.
- [12] Rodriquez M, Cretoso SC, Euterpio MA, et al. Fast Determination of Underivatized Gentamicin C Components and Impurities by LC–MS Using a Porous Graphitic Carbon Stationary Phase[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407 (25): 7691–7701.
- [13] Wei Z, Shi X, Lian R, et al. Exclusive Production of Gentamicin C1a from *Micromonospora Purpurea* by Metabolic Engineering[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2019, 8 (4): 267–275.
- [14] 常艳, 姚尚辰, 胡昌勤. 《中国药典》2015年版庆大霉素C组分限度修订——从相对含量到绝对含量的飞跃[J]. *中国抗生素杂志*, 2016, 41 (1): 1–15.
- [15] Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC, et al. Structure of the A Site of *Escherichia Coli* 16S Ribosomal RNA Complexed with an Aminoglycoside Antibiotic[J]. *Science*, 1996, 274: 1367–1371.
- [16] Selimoglu E. Aminoglycoside Induced Ototoxicity[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13 (1): 119–126.
- [17] Quiros Y, Vicente-vicente L, Morales AI, et al. An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin[J]. *Toxicol Sci*, 2011, 119 (2): 245–256.
- [18] Jasko DJ, Bedford SJ, Cook NL, et al. Effect of Antibiotics on Motion Characteristics of Cooled Stallion Spermatozoa[J]. *Theriogenology*, 1993, 40 (5): 885–993.
- [19] Aurich C, Spergser J. Influence of Bacteria and Gentamicin on Cooled–stored Stallion Spermatozoa[J]. *Theriogenology*, 2007, 67 (5): 912–918.
- [20] Anel-lopez L, Riesco MF, Montes-garrido, et al. Comparing the Effect of Different Antibiotics in Frozen–Thawed Ram Sperm: Is It Possible to Avoid Their Addition[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 1–11.
- [21] Zhou H, Mckiernan SH, Ji W. Effect of Antibiotics on Development in Vitro of Hamster Pronucleateova[J]. *Theriogenology*, 2007, 54 (7): 999–1006.
- [22] Han QQ, Li Y, Ji X, et al. The Addition of Antibiotics to Embryo Culture Media Caused Altered Expression of Genes in Pathways Governing DNA Integrity in Mouse Blastocysts[J]. *BioRxiv*, 2022, DOI: 10.1101/2022.03.29.486218.
- [23] Biernacki B, Wlodarczyk B, Minta M. Evaluation of the Developmental Toxicity of Gentamicin Using Postimplantation Rat Whole Embryo Culture[J]. *Bulletin–Veterinary Institute in Pulawy*, 2001, 45: 347–352.
- [24] Cohen S, Samadikuchaksaraei A, Polak JM, et al. Antibiotics Reduce the Growth Rate and Differentiation of Embryonic Stem Cell Cultures[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12 (7): 2025–2030.
- [25] Varghese DS, Parween S, Ardah MT, et al. Effects of Aminoglycoside Antibiotics on Human Embryonic Stem Cell Viability during Differentiation in Vitro[J]. *Stem Cells Int*, 2017: 1–19.
- [26] Ryu AH, Eckalbar WL, Kreimer A, et al. Use Antibiotics in Cell Culture with Caution: Genome-wide Identification of Antibiotic-induced Changes in Gene Expression and Regulation[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 1–9.
- [27] Liu J, Tang S, Xu W, et al. Detrimental Effects of Antibiotics on Mouse Embryos in Chromatin Integrity, Apoptosis and Expression of Zygotically Activated Genes[J]. *Zygote*, 2011, 19 (2): 137–145.
- [28] 国家卫生计生委办公厅. 抗菌药物临床应用指导原则 (2015年版) [EB/OL]. (2015–08–27) [2022–05–20]. <http://www.gov.cn/foot/site1/20150827/9021440664034848.pdf>.
- [29] 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2020: 1577–1578.
- [30] 吴婧婧. 浅析紫外分光光度测定硫酸庆大霉素制剂的含量[J]. *饮食保健*, 2021 (3): 280.
- [31] 单海峰. 荷移–紫外分光光度法测定硫酸庆大霉素含量[J]. *浙江化工*, 2017, 48 (4): 52–54.
- [32] Liu QY, Li JF, Song XQ, et al. Simultaneous Determination of Aminoglycoside Antibiotics in Feeds Using High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection[J]. *Royal Society Of Chemistry*, 2017, 7: 1251–1259.
- [33] 王立萍, 姚永清, 梅芊, 等. HPLC–ELSD法测定硫酸庆大霉素片的组分和有关物质[J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44 (5): 558–562.
- [34] Joseph A, Rustum A. Development and Validation of a RP–HPLC Method for the Determination of Gentamicin Sulfate

- and its Related Substances in a Pharmaceutical Cream Using a Short Pentafluorophenyl Column and a Charged Aerosol Detector[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51 (3): 521-531.
- [35] Stypulkowska K, Blazewicz A, Fijalek Z, et al. Determination of Gentamicin Sulphate Composition and Related Substances in Pharmaceutical Preparations by LC with Charged Aerosol Detection[J]. *Chromatographia*, 2010, 72 (11-12): 1225-1229.
- [36] 牛华星, 陈玲, 等. 高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定鸡肝中庆大霉素残留量[J]. *山东畜牧兽医*, 2019, 40(10): 11-13.
- [37] Rodriquez M, Cretoso DS, Euterpio MA, et al. Fast Determination of Underivatized Gentamicin C Components and Impurities by LC-MS Using a Porous Graphitic Carbon Stationary Phase[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407 (25): 7691-7701.
- [38] Minohara S, Fujishiro M, Lee XP, et al. High-throughput Identification and Determination of Aminoglycoside Antibiotics in Human Plasma Using UPLC-Q-ToF-MS[J]. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2021, 27 (1): 63-70.
- [39] Arsand JB, Jank L, Martins MT, et al. Determination of Aminoglycoside Residues in Milk and Muscle Based on a Simple and Fast Extraction Procedure Followed by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry and Time of Flight Mass Spectrometry[J]. *Talanta*, 2016, 154: 38-45.
- [40] 刘少刚, 吴洁. ELISA测定疫苗中庆大霉素含量的结果评价分析[J]. *中外医疗*, 2011, 30(17): 128-129, 140.

(收稿日期 2022年6月5日 编辑 郑丽娥)