

Determinación de residuos de quinolonas en alimentos de origen animal mediante electroforesis capilar espectrometría de masas

A. Juan-García, Y. Picó y G. Font

Laboratori de Bromatologia i Toxicologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València
Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n, 46100 Burjassot, València, tel. 96 3544958 fax.96354954
e-mail: ana.juan@uv.es

Resumen

Se describe un método para el análisis de residuos de cinco quinolonas por electroforesis capilar (EC)-espectrometría de masas (EM). Se emplea la espectrometría de masas con simple cuadrupolo con una fuente en modo de ionización positiva a presión atmosférica electrospray (EM-ESI). El proceso implica la preparación de la muestra con extracción en fase sólida (EFS). El tampón utilizado fue 60 mM de carbonato amónico pH 9.2. El simple cuadrupolo proporciona la fragmentación de los compuestos que confirma la identidad de cada uno de acuerdo con la legislación vigente. Mediante la utilización de este método, danofloxacina, enrofloxacina, flumequina, ofloxacina y ácido pipemídico se analizaron en muestras adicionadas de pollo y pescado. Las recuperaciones a concentraciones de 50 ng/g fueron entre 62-99 % excepto para flumequina que proporcionó recuperaciones superiores al 45 % con una desviación estándar relativa entre un 9 y 16 % y el límite de detección igual para todos los analitos. Se analizaron 40 muestras de pollo y pescado recogidas de diferentes supermercados. Mediante la utilización de este método se detectó la presencia de enrofloxacina en una muestra de pollo.

Palabras clave: Antibióticos/ Quinolonas / Electroforesis capilar / Espectrometría de masas/ Simple cuadrupolo / Pescado / Pollo

Abstract

A specific capillary electrophoretic (CE)-mass spectrometry (MS) method is described for the analysis of five quinolone residues. Mass spectrometry using a single quadrupole with electrospray source (MS-ESI) in positive ionization mode is used. The procedure involves a common sample preparation by solid phase extraction (SPE) on disposable cartridges. The most suitable electrolyte is 60 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ at pH 9.2. Single quadrupole provides fragmentation to confirm identities according to the current legislation. Using this method, danofloxacin, enrofloxacin, flumequine, ofloxacin, and pipemidic acid are analyzed in fortified samples of chicken and fish. Recoveries at levels of 50 ng/g were 62-99 %, except for flumequine, which gives recoveries > 45 %. Relative standard deviations (RSDs) are from 9 to 16 % and the limit of detection (LOD) is equal (20 ng/g) for the five analytes. Forty samples of chicken and fish

taken from different local markets are analyzed. Enrofloxacin is also determined in incurred chicken muscle using this method.

Key words: Antibiotics/ Quinolones / Capillary electrophoresis / Mass spectrometry / Single quadrupole / Fish / Chicken.

Introducción

Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos sintéticos, utilizados en humanos y en medicina veterinaria, que presentan un esqueleto común: 4-oxo-1,4-dihidroquinolina. Estos compuestos son activos frente a un amplio espectro de bacterias gram-negativas y gram-positivas. La presencia de residuos de quinolonas en los alimentos de origen animal supone un riesgo para la salud ya que pueden resultar tóxicos y dar lugar a reacciones de hipersensibilidad y artropatías [1,2].

En la Unión Europea (UE) el uso de medicamentos veterinarios esta regulado por el Reglamento 2377/90/EC [3], el cual describe el proceso para establecer los límites máximos de residuos (LMRs) de productos veterinarios en alimentos de origen animal. La normativa y criterios de seguimiento para el control de residuos se explica dentro del marco de la Directiva 96/23/EC [4] en la Resolución de la Comisión 657/2002/EC [5], de acuerdo con el manejo de métodos analíticos para la determinación de residuos orgánicos y contaminantes en animales y en sus productos derivados. De acuerdo con estos reglamentos, no hay obligación de utilizar métodos estandarizados para el control de residuos de alimentos de origen animal, sin embargo, se aplica un criterio para abordarlo, basado en características, límites y condiciones que deben reunir los métodos analíticos que se utilizan.

En la literatura se encuentran tres revisiones que describen la determinación de quinolonas en fluidos biológicos o en tejidos animales [6-8]. El método más común para el análisis de residuos de quinolonas implica la extracción con un disolvente apropiado seguido por uno o más procesos de purificación, y determinación por cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM).

Los métodos por electroforesis capilar son adecuados para el análisis de antibióticos, pero todavía precisa de muchas investigaciones para que sea una técnica conocida y de expansión en el campo del análisis de residuos de medicamentos en alimentos [9,10]. En algunos estudios, se determinan quinolonas en tejidos animales por EC-UV [11-17], y otros por fluorescencia inducida por láser [18]. Sin embargo en estos casos la Directiva de UE precisa de un análisis de confirmación. Comúnmente la EC se ha unido por electrospray (ESI) a detectores de EM, como el simple cuadrupolo, triple cuadrupolo (QqQ), cuadrupolo con trampa de iones (QTI), tiempo de vuelo (TOF) y cuadrupolo tiempo de vuelo (QqTOF) [19-21]. Sin embargo pocos han sido

los trabajos que se han publicado por aplicación de la EC-EM para la determinación de quinolonas. McCourt *et al* [22] publicaron la optimización de parámetros experimentales para la determinación de nueve quinolonas por EC acoplada a la EM con simple cuadrupolo, pero no se intentó la aplicación a muestras reales. En este trabajo se presenta un método de análisis para la separación y cuantificación de cinco quinolonas, enrofloxacina, danofloxacina, ácido pipemídico, flumequina y ofloxacina, en músculo de pollo y pescado, usando EC-EM. En la electroforesis capilar se optimizaron el tipo de tampón, pH y concentración. Con espectrometría de masas simple cuadrupolo se estableció una mejor selectividad. Finalmente, el método desarrollado se aplicó para el análisis de estos medicamentos en muestras de pollo y pescado recogidas de supermercados. Hasta la actualidad la determinación de quinolonas utilizando EC-ESI-EM en músculo de pollo y pescado no se encuentra en la bibliografía.

Material y métodos

Reactivos

Danofloxacina, flumequina, ofloxacina y ácido pipemídico se obtuvieron de Riedel-de-Haën (Sleeze, Alemania) y enrofloxacina fue cedida amablemente por Cenavis (Reus, España). Se prepararon disoluciones patrón de 1000 mg/ml en metanol y se mantuvieron refrigeradas a 4°C en viales. Diariamente se prepararon mezclas a diferentes concentraciones a partir de las disoluciones patrón en el tampón de separación. Se preparó la disolución de mezcla de las quinolonas para fortificar las muestras con 5µg/ml de cada patrón en metanol.

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de calidad HPLC. Carbonato amónico y ácido trifluoroacético se compraron a Fluka (Madrid, España). Hidróxido sódico, hexano, acetonitrilo se obtuvieron de Scharlau (Barcelona, España), ácido fosfórico y sodio dihidrógeno fosfato de Panreac (Barcelona, España), metanol y diclorometano se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua desionizada ultra pura (<18.2 MΩ cm de resistividad) se obtuvo de Milli-Q SP Reagent Water System (Millipore, Bedford, MA, USA). Los filtros de nylon (0.45 µm) se obtuvieron de Análisis Vínicos (Tomelloso, España).

La fase sólida con diámetro de partícula de 45-55 µm y de poro de 60 Å fue octadecil sílice (MFE-Pak C₁₈) adquirida de Análisis Vínicos. La fase sólida (500 mg) se introduce en una columna de vidrio 100 x 9 mm DI realizadas a medida por Marcelo Galssware (Valencia, España).

Instrumentación

Los experimentos se desarrollaron utilizando un equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) con un espectrómetro de masas Agilent 1100 series MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). El acoplamiento de EC al EM se

llevo a cabo con un G1607 Agilent EC-EM, bombas HP 1100 y un adaptador de detección externo (EDA) y cartuchos ya descritos en otros trabajos (Beckman) [23, 24].

Las inyecciones de la muestra se realizaron aplicando 0.5 psi de presión durante 5 s. La separación se llevo a cabo en un capilar de sílice fundida (Supelco, Madrid, España) de 75 μm DI, 375 μm DE de una longitud total de 75 cm, de los cuales 50 están termostatizados y 25 cm a temperatura ambiente. El recubrimiento de poliamida se eliminó del final del capilar (ca. 5 mm) para mantener estable el electrospray. El voltaje aplicado fue de 20kV, y la temperatura del capilar se mantuvo a 20°C. El electrolito fue 60 mM de carbonato amónico pH 9.2. La separación electroforética se realizó aplicando presión de 30 mbar en el final del capilar. Al principio de cada inyección el capilar se acondicionó con 0.1 M de hidróxido sódico durante 10 min y con el tampón de separación otros 10 min.

El líquido envolvente utilizado fue el mismo que el tampón de separación, se estableció a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ por una bomba equipada de un divisor de flujo de 1:100. La ionización por electrospray (ESI-EM) se realizó en modo positivo, y el voltaje del capilar se estableció en 4.0 kV. El gas de secado utilizado fue nitrógeno a 250°C con flujo 7 l/min. La presión del gas nebulizador (nitrógeno) fue de 10 psi.

El espectro de masas se adquirió con HP-MSD en modo de barrido completo (desde m/z 100 a 500 con un tiempo de barrido de 0.75 s) y monitorización selectiva de iones (SIM) (moléculas protonadas $[\text{M}+\text{H}^+]$ de m/z 358 para danofloxacina, m/z 362 para ofloxacina, m/z 360 para enrofloxacina, m/z 304 para ácido pipemidico y m/z 262 para flumequina) con ganancia de 3, voltaje de fragmentador 70 V y un tiempo de espera de 63 ms.

Las condiciones electroforéticas del equipo se llevaron a cabo en un Software System Gold versión 2.2, los parámetros del espectro de masas y del informe de simple cuadrupolo fue adquirido por un HP Chem Station versión A.06.03, y el análisis de datos se controló por un Esquire Control versión 5.1 y el Data Analysis version 3.1 de Bruker. La EC y el EM se conectaron y sincronizaron por una señal de pulso externa, programada por un equipo electroforético.

Preparación de la muestra

El proceso de extracción que se presenta se basa en el método propuesto por Horstkotter et al [18]. Se pesaron exactamente cinco gramos de músculo de pollo o pescado triturados y se introdujeron en tubos de centrifuga de 20 ml. Las muestras fortificadas se prepararon por adición del volumen adecuado de las disoluciones patrón de quinolonas (desde 10 a 100 μl). Las muestras fortificadas se dejaron 15 min a temperatura ambiente con el fin de asegurar una distribución adecuada de las quinolonas en la matriz. Posteriormente la muestra se mezcló con 5 ml de 50 mM de sulfato sódico anhidro pH 7, con ayuda de un agitador durante 10 min y se realizó la extracción dos veces con 20 y 10 ml de diclorometano con agitación durante 5 min. Las fases acuosas y orgánicas se separaron por centrifugación en una Macrotonic Selecta (J.P.

Selecta SA, Abrera, España) durante 5 min a 2500 rpm. La capa orgánica se recogió en un tubo de centrifuga de 40 ml y se extrajo dos veces con 5 ml de hidróxido sódico 0.5 M. La fase acuosa se separo del diclorometano centrifugando a 2500 rpm durante 5 min, se pasó a un vial y se ajustó a pH 7 con 200 mM de ácido fosfórico y se desengrasó por extracción con 10 ml de hexano. La fase acuosa se pasó a través de una columna de C₁₈ previamente acondicionada con 10 ml de metanol y 10 ml de agua con flujo de 2 ml/min. La elución de la quinolonas se realizó con 2 ml de 4% de ácido trifluoroacético en agua-acetonitrilo (25:75, v/v), seguido de 1 ml de acetonitrilo.

El eluato se recogió en un tubo graduado de 10 ml y se concentró con corriente de nitrógeno en un TurboVap^{LR} Concentration Work Station de Zymark (Hopkinton, MA, USA) sin llegar a sequedad, y se redisolvió con 0.5 ml de disolución tampón.

Resultados y discusión

Optimización de las condiciones de EC-EM

El acoplamiento de la EC a la EM, requiere el uso en EC de tampones volátiles que contengan ácido fórmico, ácido acético, carbonato amónico o acetato de amonio. Cuatro de las quinolonas estudiadas tienen un grupo carboxílico y un enlace piperazinilo incluyendo grupos amino, que pueden ser catiónicos, anfóteros y aniónicos, dependiendo del pH. Debido a esto, los compuestos se pueden analizar por EC alrededor de un cierto rango de pH con diferente separación selectiva. Sin embargo, la flumequina tiene solamente un grupo carboxílico cargado negativamente a pH básico. Como se ha publicado recientemente, a pH básico (entre 8 y 9.50) se obtiene una separación mejor de las quinolonas que a pH ácido o fuertemente alcalino [16, 25, 26]. Utilizando como tampón de separación carbonato amónico 60 mM, pH 9.2, 25 kV y presión de 30 mbar durante la inyección, la separación de las 5 quinolonas se realizó en 20 min. Los tampones de carbonatos se han utilizado para la separación de quinolonas por EC-EM en trabajos previos [22].

El flujo del líquido envolvente es un parámetro importante para el análisis por EC-EM, y su pH afecta a la sensibilidad de la ESI-EM. El efecto del pH en el líquido envolvente por la sensibilidad ESI-EM se probó utilizando tres soluciones: 0.5% de ácido acético en agua (pH 3), 60 mM acetato de amonio (pH 7) y 60mM de carbonato amónico en agua (pH 9.2). El EM proporciona mejores señales cuando se utiliza carbonato amónico 60 mM. La utilización de soluciones básicas (pH 9.2) no implica una disminución de la sensibilidad comparado con el pH bajo del líquido envolvente. La adición de disolventes orgánicos en el líquido envolvente (metanol, acetonitrilo e isopropanol) se probó, pero ni la señal en EM ni la estabilidad de la interfase de electrospray mejoraron; de modo que las pruebas se llevaron a cabo con tampón carbonato amónico 60 mM. Esta observación empírica esta de acuerdo con la experiencia

general de que el tampón de separación es el mejor líquido envolvente [22-24] para el acoplamiento EC-EM.

Otro parámetro importante, es el efecto del flujo del líquido envolvente en la sensibilidad de ESI y se ha investigado en el rango de 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. La aplicación de presión para la separación en el capilar, disminuyó el tiempo de análisis y estabilizó el spray en la interfase ESI [27]. La aplicación de 30 mbar aumenta el flujo en 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Para las condiciones estudiadas, el líquido envolvente presenta un pequeño efecto en la sensibilidad. A flujos altos (15 $\mu\text{l}/\text{min}$), la sensibilidad disminuye, probablemente debido al efecto de dilución con el mismo líquido envolvente. A flujos bajos (< 6 $\mu\text{l}/\text{min}$), la sensibilidad disminuye un poco, probablemente debido a que estos flujos tan bajos pueden estabilizar la fuente del spray. De acuerdo con Frommberger et al [28], un electrospray estable no se puede alcanzar con flujos inferiores a 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. En este estudio, con flujo entre 8 y 12 $\mu\text{l}/\text{min}$ se consigue mayor estabilidad y sensibilidad. Por lo tanto, los experimentos se llevaron a cabo con 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Este flujo es relativamente alto comparado con los valores propuestos por otros autores que utilizan solo EC [23, 24, 28]. Sin embargo, la razón puede ser otra diferente a la utilización de presión en EC, por ejemplo la temperatura del capilar del electrospray. La temperatura es mayor que con respecto a muchos de estos estudios, debido a que el traslado de disolvente y agua tiene mayor temperatura de ebullición comparado con la de disolventes orgánicos [28].

En la figura 1 se muestra la estructura química y el peso molecular de las quinolonas estudiadas y se destacan los pesos moleculares (PM). El espectro de masas obtenido con simple cuadrupolo muestra como ion principal, el pico correspondiente al de la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ que corresponde a $m/z = 358$ para danofloxacina, $m/z = 360$ para enrofloxacina, $m/z = 362$ para ofloxacina, $m/z = 304$ para ácido pipemídico y $m/z = 262$ para flumequina.

Validación del método

Con el fin de mejorar la sensibilidad, se aplicó un proceso de extracción que permita una concentración de hasta 10 veces. El método fue validado usando tanto muestras de músculo de pollo como de pescado, adicionadas con diferentes niveles de mezcla de patrón de quinolonas y sujetas al proceso de extracción descrito. Los límites de detección y de cuantificación se definieron respectivamente como la señal correspondiente a 3 y 10 veces la desviación estándar. El método propuesto fue validado en términos de repetitividad y reproducibilidad de tiempo de migración y de área del pico, límite de detección y linealidad. Los resultados obtenidos para las muestras de pollo están resumidas en la tabla 2. La repetitividad se calculó a partir de seis análisis cuantitativos (en un mismo día) y la reproducibilidad a partir de 4 días consecutivos para el mismo extracto.

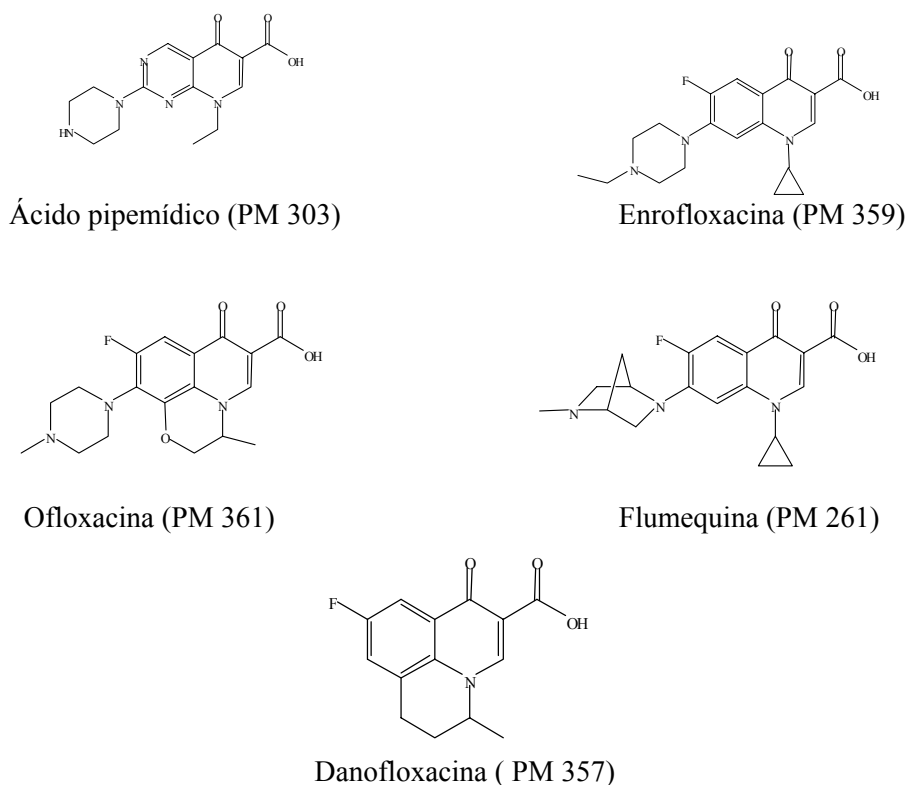


Fig 1. Estructura de las quinolonas estudiadas.

Tabla 2.- Repetitividad (en un mismo día) de tiempo y de migración y límites de detección obtenidos tras el análisis de quinolonas adicionadas a muestras de músculo de pollo con el procedimiento propuesto por EC-ESI-EM.

Quinolonas	EC-UV			EC-ESI-EM		
	T _m (min)	DSR ^a (%, n=5)	LD (ng/g)	T _m (min)	DSR ^a (%, n=5)	LD (ng/g)
Danofloxacin	7.0	1.3	5	15.7	2.2	20
Ofloxacin	7.5	1.7	10	16.6	2.8	20
Enrofloxacin	7.8	2.0	18	17.0	2.6	20
Ácido Pipemídico	8.3	2.0	20	17.6	2.8	20
Flumequina	9.6	2.3	20	19.3	3.0	20

^aDSR: desviación estándar relativa en un mismo día

LD: límite de detección

Las desviaciones standard relativas (DSR) de los tiempos de migración para las quinolonas estudiadas fueron inferiores a 2.6 en un mismo día y 5.1 entre días diferentes. Los límites de detección se calcularon con los electroferogramas en modo SIM en el EM y de los electroferogramas del cromatograma del ion extraído en EC-EM de muestras adicionadas a 50 ng/g. Se observó una excelente linealidad en el rango de concentración de 50-5000 ng/g, con un

coeficiente de correlación mejor que 0.9992. Los resultados obtenidos para muestras de pescado fueron muy parecidas (no se muestra).

La tabla 3 muestra la exactitud y precisión obtenida en los extractos de quinolonas de las muestras de pollo y pescado a 50 ng/g utilizando EC-ESI-EM. Estos parámetros para muestras adicionadas a concentraciones elevadas de quinolonas (500 ng/g) proporcionan valores similares (no mostrados).

Tabla 3. Resultados del análisis de quinolonas adicionadas en muestras de pollo y pescado por EC-ESI-EM

Quinolonas	<i>Pollo</i>				<i>Pescado</i>			
	Cantidad (mg/kg)	DSR (% <i>, n=5</i>)	Rec. (%)	LMRs (µg/kg)	Cantidad (mg/kg)	DSR (% <i>, n=5</i>)	Rec. (%)	LMRs (µg/kg)
Danofloxacin	50	12	75	200	50	12	78	100
Ofloxacin	50	10	99	200	50	9	90	n.e
Enrofloxacin	50	11	65	100*	50	10	68	100*
Ácido pipemídico	50	12	81	n.e	50	13	84	n.e.
Flumequina	50	15	45	400	50	16	52	200

En general se obtuvieron buenas recuperaciones, tanto en músculo de pollo como en el de pescado, para 4 de las quinolonas estudiadas. Flumequine proporcionó recuperaciones inferiores al 45%, debido a su termolabilidad y a que se produjeron algunas pérdidas durante el proceso de evaporación. Las demás recuperaciones están en el rango de 60-93%. La DSR (en un mismo día) fueron adecuadas tal y como se muestra en la tabla 3.

El método propuesto es suficientemente sensible para analizar estas quinolonas en pescado y carne, ya que los límites de cuantificación obtenidos están por debajo de los Límites Máximos de Residuos (LMRs) (100 a 200 ng/g) establecidos en la Directiva 2377/90 de la Unión Europea [3]. Las figuras 3 y 4 muestran el cromatograma de una disolución standard de las 5 quinolonas a los límites de cuantificación, un extracto de músculo de pollo adicionado a los límites de cuantificación y un extracto de una muestra de pollo que contenía enrofloxacin, usando EC-endógenos de los tejidos, ni distorsiones en la línea base.

Aplicación a muestras reales

Se cogieron varias muestras de tejido de pollo y pescado de supermercados de la ciudad de Valencia. De las muestras recogidas, 25 eran de pollo y 15 de pescado (5 truchas, 5 doradas, 5 lubinas) pertenecientes a una piscifactoría. Ninguna de las quinolonas estudiadas se detectó en estas muestras.

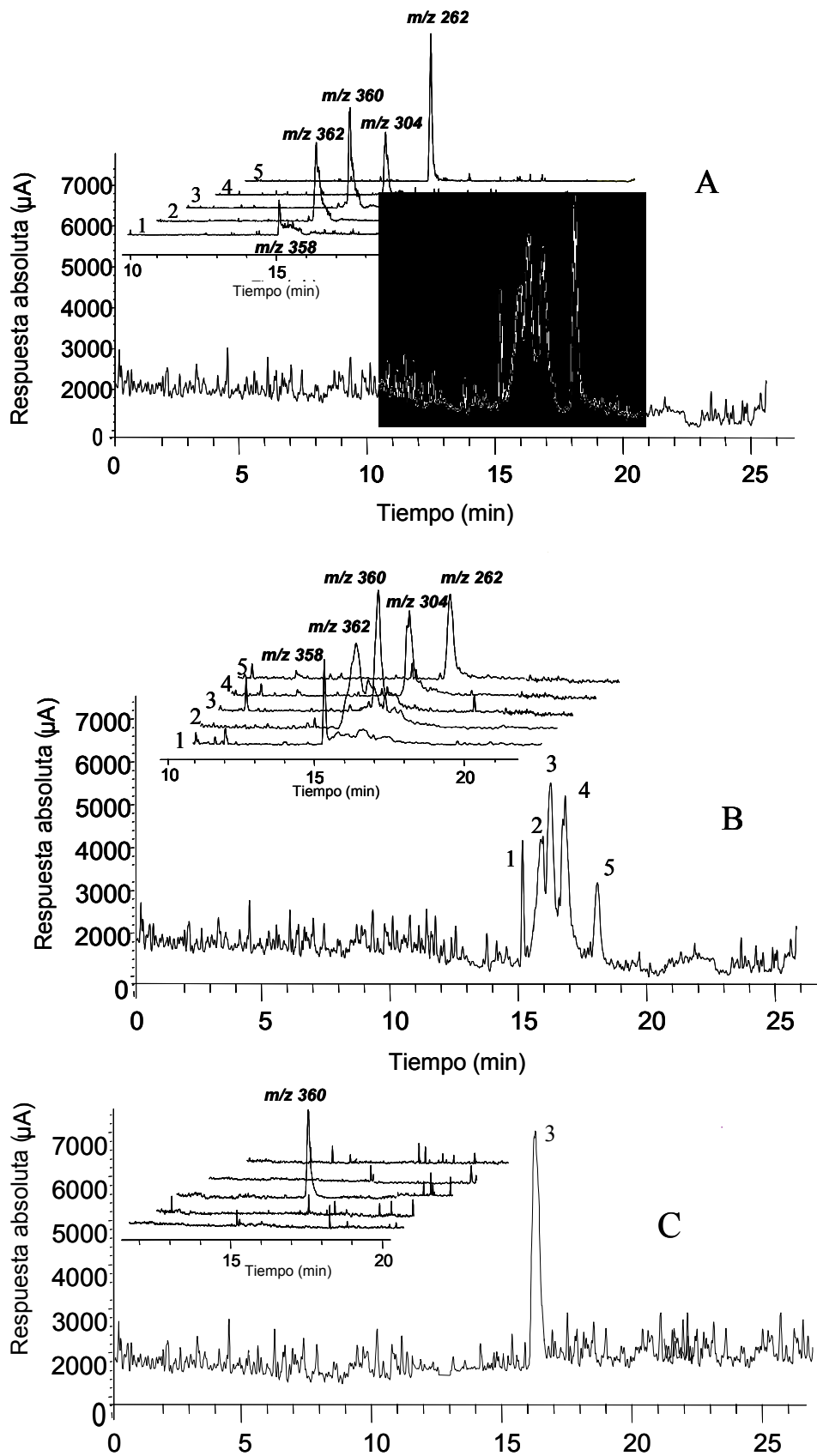


Figura 3. Electroferogramas obtenidos por ESI-MS de una mezcla standard de las 5 quinolonas a 0.5 µg/mL (A) de un extracto de musculo de pollo adicionado a 50 ng/g equivalente a concentración de 0.5 µg/mL (B), y muestra de pollo con 80 ng/g (C)

La figura 3C muestra el electroferograma por EC-EM de extractos de músculo de pollo tratados. Las concentraciones encontradas en las muestras dos días después de ser tratadas fueron de 80 ng/g.

Conclusiones

Se ha desarrollado un procedimiento simple, robusto y económico por EC-EM para el análisis de quinolonas utilizando un capilar de sílice fundida y un tampón de separación volátil y alcalino. El método propuesto implica una extracción de las quinolonas en diclorometano y purificación por extracción en fase sólida, seguido de separación y detección de quinolonas por EC con detección ESI-EM. La identificación y cuantificación de 5 quinolonas en músculo de pollo y pescado se alcanzaron con éxito utilizando EC-EM. El método fue validado en músculo de pescado y pollo de acuerdo con la Directiva 2002/657/CE. Se obtuvieron resultados satisfactorios con respecto a la selectividad, linealidad y precisión. Los límites de cuantificación que se consiguieron fueron inferiores a los límites máximos de residuos establecidos por la Directiva Europea.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y la European Regional Developments Funds (ERDF) (proyecto AGL2003-01407). Ana Juan García agradece al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca predoctoral FPI.

Bibliografía

1. Woodward K N, In: Watson, D.H. (Ed.), Pesticide, veterinary and other residues in food, CRC Press, Boca Raton, FL, 2004, pp. 157-174.
2. Botsoglou N A, Fletouris D J, In: Nollet L M L (ed), Handbook of Food Analysis, Residues and other food component analysis, Marcel Dekker, Ghent, 2004, pp. 931-1037.
3. Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuff of animal origin, Off.J.Eur.Comm. L224, 1990, 1-20.
4. Council Directive 96/23/EC of April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/18/EEC and 91/664/EEC, Off.J.Eur.Comm. L125, 1996, 10-18.
5. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning to the performance of analytical methods and the implementation of the results (Text with EEA relevance), Off.J.Eur.Comm. L221, 2002, 8-62.

6. Belal F, Al-Majed A A, Al-Obaid A M, (1999). Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials. *Talanta*, 50: 765-786.
7. Hernandez-Arteseros J A, Barbosa J, Compano R, Prat M D, (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A* 945: 1-24.
8. Carlucci G,(1998). Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 812: 343-367.
9. Simo C, Barbas C, Cifuentes A, (2005). Capillary electrophoresis-mass spectrometry in food analysis. *Electrophoresis* 26: 1306-1318.
10. Juan-Garcia A, Font G, Pico Y, (2005). Determination of organic contaminants in food by capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* 28: 793-812.
11. Beltran J L, Jimenez-Lozano E, Barron D, Barbosa J, (2004). Determination of quinolone antimicrobial agents in strongly overlapped peaks from capillary electrophoresis using multivariate calibration methods. *J. Anal. Chim. Acta* 501: 137-141.
12. Saad B, Mohamad R, Mohamed N, Lawrence G D, Jab M S, Saleh M I, (2002). Determination of oxolinic acid in feeds and cultured fish using capillary electrophoresis. *Food Chem.* 78: 383-388.
13. Jimenez-Lozano E, Roy D, Barron D, Barbosa J, (2004). Effective sorbents for solid-phase extraction in the analysis of quinolones in animal tissues by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25: 65-73.
14. Barron D, Jimenez-Lozano E, Bailac S, Barbosa J, (2002). Determination of difloxacin and sarafloxacin in chicken muscle using solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B-Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 767: 313-319.
15. Barron D, Jimenez-Lozano E, Bailac S, Barbosa J, (2003). Simultaneous determination of flumequine and oxolinic acid in chicken tissues by solid phase extraction and capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 477: 21-27.
16. Barron D, Jimenez-Lozano E, Cano J, Barbosa J, (2001). Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 759: 73-79.
17. Hernandez M, Borrull F, Calull M, (2002). Using nonaqueous capillary electrophoresis to analyze several quinolones in pig kidney samples. *Electrophoresis* 23: 506-511.
18. Horstkotter C, Jimenez-Lozano E, Barron D, Barbosa J, Blaschke G, (2002). Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in chicken muscle by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 23: 3078-3083.
19. Schmitt-Kopplin P, Englmann M, (2005). Capillary electrophoresis-mass spectrometry: Survey on developments and applications 2003-2004. *Electrophoresis* 26: 1209-1220.
20. Smyth W F,(2005). Recent applications of capillary electrophoresis-electrospray ionisation-mass spectrometry in drug analysis. *Electrophoresis* 26: 1334-1357.

21. Schmitt-Kopplin P, Frommberger M, (2003). Capillary electrophoresis - mass spectrometry: 15 years of developments and applications. *Electrophoresis* 24: 3837-3867.
22. McCourt J, Bordin G, Rodriguez A R, (2003). Development of a capillary zone electrophoresis-electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for the analysis of fluoroquinolone antibiotics. *J. Chromatogr. A* 990: 259-269.
23. Juan-Garcia A, Font G, Pico Y, (2005). Quantitative analysis of six pesticides in fruits by capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26: 1550-1561.
24. Rodriguez R, Manes J, Pico Y, (2003). Off-line solid-phase microextraction and capillary electrophoresis mass spectrometry to determine acidic pesticides in fruits. *Anal. Chem.* 75: 452-459.
25. Hernandez M, Borrull F, Calull M, (2000). Determination of quinolones in plasma samples by capillary electrophoresis using solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B-Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 742: 255-265.
26. Schmitt-Kopplin P, Burhenne J, Freitag D, Spiteller M, Kettrup A, (1999). Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase. *J. Chromatogr. A* 837: 253-265.
27. Fernandez F M, Vadiello J M, Kimmel J R, Wetterhall M, Markides K, Rodriguez N, Zare R N, (2002). Hadamard transform time-of-flight mass spectrometry: A high-speed detector for capillary-format separations. *Anal. Chem.* 74: 1611-1617.
28. Frommberger M, Hertkorn N, Englmann M, Jakoby S, Hartmann A, Kettrup A, Schmitt-Kopplin P, (2005). Analysis of N-acylhomoserine lactones after alkaline hydrolysis and anion-exchange solid-phase extraction by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26: 1513-1522.