

LC-MS/MS를 이용한 우유 중 덤사메타손의 잔류 분석법 개발

차춘남 · 박은기¹ · 유창열² · 이성중³ · 손송이⁴ · 김석⁴ · 이후장^{4*}

경상대학교 공과대학, 산업시스템공학부, ¹고신대학교 의과대학, 인문사회의학교실,

²경남도립남해대학, 스마트융합정보과, ³경상대학교 화학과 · 생명과학연구소,

⁴경상대학교 수의과대학 · 동물의학연구소

Development of an Analytical Method for the Determination of Dexamethasone in Bovine Milk Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry

Chun-Nam Cha, Eun-Kee Park¹, Chang-Yeul Yoo², Sung Joong Lee³, Song-Ee Son⁴, Suk Kim⁴, and Hu-Jang Lee^{4*}

*Engineering Research Institute and Department of Industrial Systems Engineering,
Gyeongsang National University, Chinju, Korea*

¹*Medical Humanities and Social Medicine, College of Medicine, Kosin University, Busan, Korea*

²*Department of Smart Information Convergence, Gyeongnam Provincial Namhae College, Namhae, Korea*

³*Department of Chemistry and Research Institute of Live Science, Gyeongsang National University, Chinju, Korea*

⁴*Institute of Animal Medicine and College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju, Korea*

(Received August 1, 2017/Revised August 20, 2017/Accepted September 5, 2017)

ABSTRACT - An analytical method for the determination of dexamethasone (DM) in bovine milk samples was developed and validated using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Milk samples were extracted by the liquid-liquid extraction based on acetonitrile. The chromatographic separation was achieved on a reverse phase C₁₈ column with gradient elution using a mobile phase of 0.1% formic acid in 95% acetonitrile. The procedure was validated according to the Ministry of Food and Drug Safety guideline determining accuracy, precision, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). Mean recoveries of DM from spiked milk samples (25, 125, and 1,250 ng/mL) were 98.9-109.6%, and the relative standard deviation was between 1.7 and 4.4%. Linearity in concentration range of 12.5-1,250 ng/mL was obtained with the correlation coefficient (r^2) of 0.9997. LOD and LOQ for the investigated DM were 0.15 and 0.5 ng/mL depending on milk samples, respectively. This method was reliable, sensitive, economical and suitable for routine monitoring of DM residues in bovine milk.

Key words : Dexamethasone, Bovine Milk, LC-MS/MS

오늘날, 전 세계 인구의 지속적인 증가로 인해, 축산식품에 대한 요구도 증가하고 있다. 이러한 요구에 부응하기 위해, 가축 생산성 증대를 위한 사육방식의 도입과 보다 많은 보조제들의 급여가 증가하고 있다¹⁾. 동물용의약품 등은 축산에 있어서 매우 중요한 역할을 담당하고 있지만, 식품 내 잔류와 내성균의 출현이 문제가 됨에 따라, 전 세계적으로 공중보건학적인 관심이 증대되고 있다²⁾.

동물용의약품 중 항생물질과 성장 호르몬제는 축산식품

을 오염시키는 주된 원인이며, 이들에 의한 축산식품 오염은 주로 식품 중 잔류에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다³⁾. 가축의 성장 및 증체를 목적으로 사용되는 호르몬제제들은 에스트로겐 및 안드로겐 수용체들에 대해 높은 친화성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 이러한 성장 호르몬들이 잔류하는 우유나 유제품을 섭취하게 되면, 인체 내분비계의 생리적 기능이 방해받아, 성장, 발달, 생식 등에 영향을 받는 것으로 보고되고 있다⁵⁾. 또한, 역학적 관점에서 보면, 동물용 성장호르몬에 오염된 우유는 사람에게서 알레르기 반응, 각종 질병 그리고 암과 같은 잠재적 위험요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

덤사메타손(dexamethasone, DM)은 인체 및 동물 약품에

*Correspondence to: Hu Jang Lee, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 52828, Korea
Tel: 82-55-772-2352, Fax: 82-55-772-2308
E-mail: hujang@gnu.ac.kr

서 광범위하게 적용되고 있는 hydroxyl cortisone으로부터 유래된 합성 glucocorticoid로서, 반추동물의 케톤증과 여러 동물들에서의 염증성 질병 치료에 사용되고 있다⁷⁾. 유럽연합을 비롯한 여러 나라들에서, 텍사메타손은 가축의 질병치료 목적으로만 사용이 허용되어 있으며, 성장촉진제로의 사용은 금지하고 있다⁸⁾. 치료목적으로 사용하는 경우에도 우유와 식용 장기들에 대해서 최대잔류허용기준을 설정하여 엄격하게 규제하고 있다⁹⁾. 국제식품규격위원회¹⁰⁾와 우리나라 식품공전¹¹⁾에 따르면, 소에서 DM의 최대잔류허용기준은 근육, 간, 신장 그리고 우유에서 각각 1.0, 2.0, 1.0, 0.3 µg/kg(우유의 경우, µg/L)로 설정되어 있다.

DM은 베타메타손, 프레드니솔론, 베클로메타손 등과 같이 스테로이드 제제에 속하며, 가축 및 사람에서 소염·진통에 탁월한 효과를 보이는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

DM의 검출을 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법들은 LC-UV 혹은 LC-MS이며, 이들 방법들은 혈청이나 요 그리고 몇몇 식용 조직들 중에서 잔류분석을 하는데 적합한 것으로 보고되고 있다^{7,13)}. 많은 분석방법들 중 단지 몇몇 방법들만이 우유 혹은 분말 우유의 분석에 적합한 것으로 알려져 있다^{13,15)}. 매우 다양한 물질들을 함유하고 있는 원유로부터 최대잔류허용기준 이하로 검출한다는 것은 매우 어려운 일이다. 앞선 연구에서⁷⁾, 간단한 시료처리 방법을 통해, 우유 중에서 DM을 검출할 수 있는 LC-APCI(+)-MS/MS가 개발되었으나, 회수율이 56%로 매우 낮았던 것으로 보고되었다. 다른 선행연구에서¹⁵⁾, 우유 중 DM을 포함한 17종의 glucocorticoid의 잔류를 동시에 검출할 수 있는 감도와 정확도가 높은 UPLC-MS/MS가 개발되었으나, 시료의 전처리 과정이 복잡하여 많은 시간이 소요되는 단점이 있는 것으로 보고되었다. 또한, 우유 중에서 DM을 포함한 7종의 항염증제를 동시에 분석할 수 있는 LC-MS/MS가 개발하였으나, 시료의 전처리 과정이 복잡한 제단백과 액체정제 과정을 포함하고 있어 많은 시간이 소요되는 단점이 있는 것으로 보고되었다¹⁶⁾.

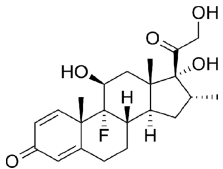
따라서 본 연구에서는 우유 중 DM의 검출을 위해 LC-MS/MS를 이용하여 기존 분석법보다 신속하고 정확하게 텍사메타손을 분석하고, 정량성 및 정밀성을 확보할 수 있는 분석법을 개발하여 국내 생산 및 수입 축산물에 대한 안전관리 강화 기반을 마련하는데 기여하고자 수행하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

DM (≥ 98.0%)과 코르티손(cortisone, ≥ 98.0%) 표준품은 Sigma-Aldrich Korea (Yongin, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. Table 1은 DM의 이화학적 특성을 나타낸 것이다. 전처리 시약으로 사용된 아세토니트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol), 개미산(formic acid, ≥ 95%) 등은 Merck

Table 1. Molecular structure and physico-chemical properties of dexamethasone

Property	Content
IUPAC Name	(8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,11,12,14,15,16-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one
CAS No.	50-02-2
Classification	Glucocorticoids
Molecular formula	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
Molecular weight	392.467 g/mol
Boiling point	568.2°C at 760 mmHg
Density	1.32 g/cm ³
Log P _{ow}	1.81 at pH 7.0
pKa	12.14
Vapor pressure	1.17 × 10 ⁻¹⁰ mmHg
Solubility in water	89 mg/L at 25°C
Solubility in solvent	25 mg/mL in ethanol
Structure	

(Darmstadt, Germany)에서 HPLC 등급으로 구입하여 사용하였고, 이외의 분석용 시약 및 용매는 특급 또는 분석용을 사용하였다. 또한, 고상추출(solid phase extraction, SPE) 카트리지(cartridge)는 6 mL의 C₁₈ column (500 mg, HyperSep, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA)를 이용하였으며, 활성화 과정을 거쳐 추출물을 흡착시킨 후 용출하는 과정에 사용하였다.

시험용 시료는 3주 동안 DM이 함유된 동물용의약품을 처치하지 않은 젖소로부터 채취한 원유를 분석 전까지 냉동(-20°C)에 보관하면서, 공시료(blank) 시험을 거쳐 DM이 잔류되지 않음을 확인한 후 시험용 시료로 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

DM 표준품 10 mg을 저울로 정밀히 달아 1,000 mL 정량플라스크에 넣고, 메탄올을 사용하여 10 mg/L이 되도록 표준원액을 조제하였다. 조제한 표준원액을 메탄올을 사용하여 단계적으로 희석하여 12.5, 25, 50, 125, 250, 1,250 ng/mL의 표준용액을 각각 준비하였다. 표준원액과 표준용액은 갈색 유리병에 담아 4°C 냉장실에 보관하면서 실험 직전에 희석하여 사용하였다.

추출 및 정제

원유 5 mL을 유리 시험관에 넣고, 10 µg/mL 농도의 내

부표준물질인 코르티손 50 μ L와 DM 표준물질을 각각 50 μ L씩을 첨가한 다음, 15초 정도 vortex mixer를 이용하여 혼합해 주었다. 혼합 후, 1 mL의 20% 삼염화아세트산을 가한 다음 vortex mixer를 이용하여 균질화 시켜 주었다. 이어서 이 용액을 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리시킨 후, 상층액을 거름종이(Whatman filter paper No. 1)로 걸러주었다. 진공분리장치와 연결된 C_{18} 카트리지를 5 mL의 메탄올과 물로 전처리한 다음, 앞서 거름종이로 거른 용액 4.5 mL을 넣고, 0.5 mL/min의 속도로 천천히 추출하였다. 추출 후, C_{18} 카트리지를 5 mL의 물로 씻어내고 진공을 이용하여 물을 완전히 제거한 다음, 5 mL의 n-hexane을 1 mL/min의 속도로 흘려주었다. 이 후에 C_{18} 카트리지를 건조시킨 다음에 분석물질들을 5 mL의 ethyl acetate로 용출하였다. 용출액을 40°C heating block 위에서 질소가스를 이용하여 건조·증발시킨 다음, 잔유물을 500 μ L acetonitrile로 녹인 후 나일론(Nylon) 0.2 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 유리 바이알에 담아 시험용액으로 사용하였다.

기기분석조건

우유 시료 중 DM 분석을 위하여 LC-MS/MS (API4000, AB SCIEX, ON, Canada)를 사용하였으며, 본 LC-MS/MS의 LC system은 Agilent 1260 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), 분석용 column은 XTerra MS C_{18} (3.0 \times 50 mm, 5 μ m, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였으며, column 온도는 30°C를 유지하였다. 또한, 이동상 용매는 95% 아세트니트릴에 개미산을 용해시켜 0.1% 농도로 만든 용매를 사용하였으며, flow rate은 0.3 mL/min으로 하였고, 크로마토그래프상 total running time은 3분으로 하였다. 질량분석기는 Triple Quad 4500 System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)을 사용하였다. 표준용액을 positive ion mode로 DP (Declustering Potential), EP (Entrance Potential), CE (Collision Energy), CXP (Collision cell Exit Potential) 등 MS 각각의 parameter를 최적화한 MRM (Multiple Reaction Monitoring) 조건을 확립하였다 (Table 2).

분석법 검증

앞서 준비한 표준용액(12.5-1,250 ng/mL)을 이용하여 검량곡선을 작성하여, 검량선의 직선성을 확인하기 위해 상관관계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 검출한계 및 정량한계는, 우유 중 최대잔류허용한계의 0.5 (0.15 ng/mL)가 되도록 DM 표준용액을 공시료에 첨가하여 ‘추출 및 정제’ 방법에 따라 처리하여 분석한 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(signal to noise ratio, S/N ratio)의 각각 3배와 10배 농도로 산출하였다. 회수율 측정은 DM이 들어있지 않음을 확인한 공시료(우유)에 DM을 첨가하여 최종농도가 25, 125, 1,250 ng/mL이 되도록 한 다음, ‘추출 및 정제’ 방법에 따라 3 반복 실험하였고, DM 표준품의 peak 면적에 대한 추출한 우유 시료의 peak 면적비로부터 DM의 회수율(%)을 구하였다. 또한, 회수율의 정밀성을 검증하기 위해, 3 반복 회수율로부터 상대표준편차를 구하였다. 측정된 정량한계, 회수율 그리고 상대표준편차는 식품의약품안전처의 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서¹⁷⁾에서 분석법 검증에 요구되는 정량한계 잔류허용기준의 1/2, 회수율 60-120% 그리고 상대표준편차 20-30% 이하를 검증기준으로 적용하였다.

Results and Discussion

LC-MS/MS

HPLC를 통과하여 질량분석기에서 검출된 DM의 머무름 시간은 0.88분이었으며, 총 run time은 3분으로 나타났다. 앞선 연구⁷⁾에서, 우유 중 DM을 LC-MS/MS로 분석하는데 머무름 시간은 6.1분이었고, 총 run time은 10분이 걸리는 것으로 보고되었다. 또한, 식품공전¹⁷⁾에서 축산식품 중 DM의 LC-MS/MS 정량분석법의 머무름 시간은 13.2분이었고, 총 run time은 25분 소요되는 것으로 나타나 있다. 본 연구에서 확립한 LC-MS/MS는 우유 중 DM의 분석시간이 앞선 연구들에 비해 매우 짧아 신속한 분석이 가능할 것으로 사료된다.

본 연구에서 확립한 LC-MS/MS는 정성 및 분석의 선택성과 검출감도를 향상시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM

Table 2. Multiple reaction monitoring condition of dexamethasone

Compound ¹⁾	Q1 mass	Q3 mass	Dwell (msec)	DP ²⁾	EP ³⁾	CE ⁴⁾	CXP ⁵⁾
DM	391.07	361.2	150	70	11	16	19
		307.1	150	70	11	38	25
CTS (IS)	359.045	329	150	85	17	14	15

¹⁾DM, dexamethasone; CTS (IS), cortisone (internal standard).

²⁾Declustering Potential volts.

³⁾Entrance Potential volts.

⁴⁾Collision Energy volts.

⁵⁾Collision cell Exit Potential volts.

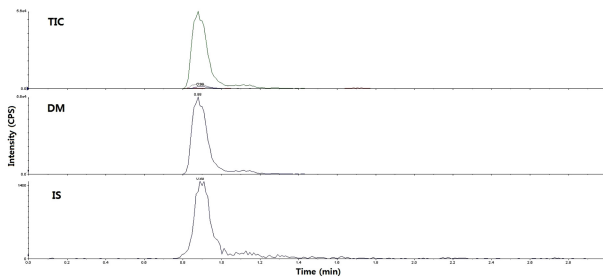


Fig. 1. LC-MS/MS chromatogram of dexamethasone (m/z 391.07 → 361.2) in standard at the maximum residue limit level (0.30 ng/mL). TIC, total ion chromatogram; DM, dexamethasone; IS, internal standard (cortisone).

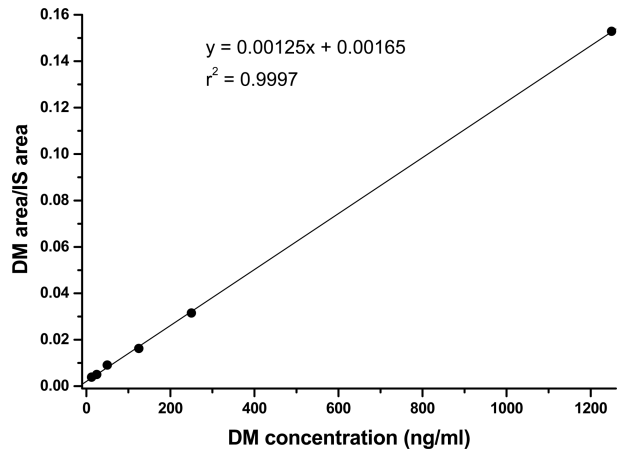


Fig. 2. Standard calibration curve, linearity and correlation coefficient (r^2) of dexamethasone in bovine milk. DM, dexamethasone; IS, internal standard (cortisone).

Table 3. Recoveries, relative standard deviations (RSD), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of dexamethasone from milk by LC-MS/MS

Spike level (ng/mL)	Recovery (%) ¹⁾	RSD (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
25	109.6	4.4		
125	106.1	2.4	0.15	0.5
1250	98.9	1.7		

¹⁾Mean of 3 replicate studies.

(multiple reaction monitoring) 모드로 분석하였으며, 충돌 에너지의 강도를 조절함으로써 생성이온(product ion)의 감응도가 코드로크 조정하였으며, 최적의 선구이온 (precursor ion)/생성이온을 선정하였다. Fig. 1은 질량분석을 위해 full scan 모드에서 DM의 크로마토그래피를 나타낸 것이다. 양이온 모드에서 $[M+H]^+$ 인 m/z 391.07이 기준이온(base ion)으로 검출되어 이를 선구이온(precursor ion)으로 선택하였으며, product ion scan을 통하여 m/z 361.2 이온이 특성 이온으로 나타나 이들을 정성이온으로 선정하였다.

분석법의 검출한계 및 정량한계

본 시험방법에 따른 분석기기의 검출한계 및 정량한계는 각각 0.15 ng/mL 및 0.5 ng/mL로 조사 되었다(Table 3). 식품공전 중 ‘식품 중 동물용의약품의 잔류허용기준’에 따르면¹⁸⁾, 우유 중 DM의 최대잔류허용기준은 0.3 ng/mL로 규정하고 있어서, 본 연구에서 확립한 분석법은 우유 중의 최대잔류허용기준 이하로 덱사메타손의 잔류를 분석하는 것이 가능한 것으로 확인되었다. 식품의약품안전처의 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서의 식품에 대한 잔류동물용의약품 분석법 기준에 따르면¹⁹⁾, 잔류허용기준이 50 ng/mL 이하인 경우, 검출한계는 잔류허용기준의 1/2 이하이어야 하며, 정량한계는 10 ng/mL 이하이어야 한다고 규정하고 있다. 따라서 본 연구에서 확립한 검출한계와 정량한계는 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서의 분석기준을 충족하고 있는 것으로 나타났다. Tölgyesi 등²⁰⁾은

우유 중 corticosteroid 5종에 대해 LC-MS/MS를 이용한 동시분석법을 수행한 결과, DM에 대한 검출한계와 정량한계가 각각 0.006와 0.02 ng/mL이었다고 보고하였다. 또한, Cherlet 등⁷⁾은 우유 중 DM 검출을 위해 LC-MS/MS를 이용한 잔류분석법을 확립한 결과, DM에 대한 검출한계와 정량한계가 각각 0.11와 0.41 ng/mL이었다고 보고하였다. 한편, Cherlet 등⁷⁾은 우유 중 DM의 정량분석법을 LC-MS/MS를 이용하여 확립한 결과, DM에 대한 검출한계와 정량한계가 각각 0.04와 0.41 ng/mL이었다고 보고하였다. 앞선 연구들과 비교하여, 본 연구에서 확립한 LC-MS/MS의 DM에 대한 검출한계와 정량한계는 Cherlet 등⁷⁾의 연구결과와는 유사한 결과를 나타내었으나, Tölgyesi 등²⁰⁾과 Cherlet 등⁷⁾의 연구결과 보다는 높게 나타났다.

검량선, 회수율 및 정밀성

본 시험에서는 DM 표준용액을 12.5, 25, 50, 125, 250 및 1,250 ng/mL의 농도로 희석하여 LC-MS/MS로 분석한 후 검량선의 직선성을 확인한 결과 상관계수가 0.9997로 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 2). Caretti 등²¹⁾은 우유 중 DM을 포함한 여러 종의 glucocorticoid 분석을 위해 확립한 LC-MS/MS법으로 DM의 검량선을 작성한 다음, 직선성을 확인한 결과 상관계수가 0.9974이었다고 보고하였다. Caretti 등²¹⁾의 연구에서 얻은 DM의 상관계수에 비해, 본 연구에서 얻은 상관계수는 다소 높게 나타났다.

Table 3은 DM의 정량분석을 위해 우유 시료에 여러 농도로 DM의 표준용액을 첨가한 후 추출·정제 방법과 기기조건으로 3회 반복 분석 후 회수율과 정밀성을 측정된 결과를 Table 3에 나타낸 것이다. 회수율과 상대표준편차의 범위는 각각 98.9-109.6%와 1.7-4.4%로 나타나, 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서¹⁹⁾에서 분석법 검증에 요구되는 검증기준을 모두 충족하는 것으로 조사되었다.

Cherlet 등⁷⁾은 LC-MS/MS를 이용하여 우유 중 DM의 정량분석을 실시한 결과, 우유에 DM 표준용액을 첨가하여 0.15-0.60 ng/mL 농도로 조성한 시료의 회수율과 상대표준편차는 각각 76.7-120%와 31.1-32.3%이었다고 보고하였다. Sun 등²²⁾은 LC-MS/MS를 이용하여 분유 중 DM을 포함하여 5종의 glucocorticoid 정량분석을 실시한 결과, 분유에 DM 표준용액을 첨가하여 1.0-5.0 ng/mL 농도로 조성한 시료의 회수율과 상대표준편차는 각각 72.2-74.9%와 7.9-14.9%이었다고 보고하였다. 본 연구에서 확립한 LC-MS/MS법의 회수율과 상대표준편차는 Cherlet 등⁷⁾과 Sun 등²²⁾의 연구와 비교하여, 높은 회수율과 높은 정밀성을 나타내었다.

이상의 결과로부터, 본 연구에서 제시한 LC-MS/MS에 의한 우유 중 DM 정량분석법의 회수율, 상대표준편차, 검출감도 등은 식품의약품안전처의 잔류동물용의약품 분석법¹⁷⁾의 기준을 모두 충족하는 것으로 나타났다. 또한, 기존 시험법에 비해 높은 회수율, 정밀성, 검출감도 그리고 빠른 분석시간을 갖고 있어서, 축산식품 중에 DM의 신속한 분석이 가능할 것으로 사료된다.

국문요약

본 연구는 우유 중에서 텍사메타손을 효과적으로 정량 분석하기 위한 LC-MS/MS법을 확립하고 이를 검증하기 위해 수행되었다. 확립된 LC-MS/MS에 대해 특이성, 검출한계, 정량한계, 정확도 및 정밀도에 대한 검증을 통하여 유효성을 확인하였다. 표준용액을 이용하여 검량성을 작성한 결과, $r^2 > 0.999$ 이상의 직선성을 확인하였고, 텍사메타손에 대한 검출한계와 정량한계는 각각 0.15와 0.5 ng/mL이었다. 또한, 회수율은 98.9-109.6%로 나타났으며, 상대표준편차는 1.7-4.4%로 나타나 정확성이 우수하였으며, 이는 식품의약품안전처의 잔류동물용의약품 분석법에서 제시한 기준에 모두 적합한 수준이었다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 LC-MS/MS법은 향후 우유 중 텍사메타손을 분석하는데 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Mainero Rocca L., Gentili A., Pérez-Fernández V., Tomai P.: Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **34**, 766-784 (2017).
2. Beyene T.: Veterinary drug residues in food-animal products: Its risk factors and potential effects on public health. *J. Veterinar. Sci. Technol.* **7**, 285 (2016).
3. Friedman M.: Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3805-3822 (2015).
4. Jeong S.H., Kang D., Lim M.W., Kang C.S., Sung H.J.: Risk assessment of growth hormones and antimicrobial residues in meat. *Toxicol. Res.* **26**, 301-313 (2010).
5. Malekinejad H., Rezaabakhsh A.: Hormones in dairy foods and their impact on public health - A narrative review article. *Iran. J. Public Health.* **44**, 742-758 (2015).
6. Khaniki G.R.J.: Chemical contaminants in milk and public health concerns: a review. *Int. J. Dairy Sci.* **2**, 104-115 (2007).
7. Cherlet M., De Baere S., De Backer P.: Quantitative determination of dexamethasone in bovine milk by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **805**, 57-65 (2004).
8. Commission of the European Communities: Council Directive 96/22/EC. *Off. J. Eur. Commun.* **L125**, 3-9 (1996).
9. Cherlet M., De Baere S., Croubels S., De Backer P.: Quantitative determination of dexamethasone in bovine plasma and tissues by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization -tandem mass spectrometry to monitor residue depletion kinetics. *Anal. Chim. Acta.* **529**, 361-369 (2005).
10. Codex Alimentarius Commission: Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL 2-2015. FAO/WHO, Rome, pp. 15 (2015).
11. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Korean Food Standards Codex. Appendix 6, Maximum residue limits for veterinary drugs. MFDS, Cheongsu (2016).
12. Lee Y., Park J.S., Kim S.D., Yang H.R., Kim E.H., Yi Y.J., Cho S.J., Jo H.B., Kim J.H., Chae Y.Z.: Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids added to foods as adulterants using LC-ESI-tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Saf.*, **28**, 247-251 (2013).
13. McDonald M., Granelli K., Sjöberg P.: Rapid multi-residue method for the quantitative determination and confirmation of glucocorticosteroids in bovine milk using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **588**, 20-25 (2007).
14. Amendola L., Garribba F., Botrè F.: 2003. Determination of endogenous and synthetic glucocorticoids in human urine by gas chromatography-mass spectrometry following microwave-assisted derivatization. *Anal. Chim. Acta.* **489**, 233-243 (2003).
15. Cui X., Shao B., Zhao R., Yang Y., Hu J., Tu X.: Simultaneous determination of seventeen glucocorticoids residues in milk and eggs by ultra-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **20**, 2355-2364 (2006).
16. Malone E.M., Dowling G., Elliott C.T., Kennedy D.G., Regan L.: Development of a rapid, multi-class method for the confirmatory analysis of anti-inflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 8132-8140 (2009).

17. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Korean Food Standards Codex. Chapter 9. General analytical method, 5. Monitoring of veterinary drug residues in foods. MFDS, Cheongsu (2016).
18. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Korea Food Standards Codex. Appendix 6. Maximum residue limits of veterinary drugs in food. Available at www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=828 (2017).
19. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Handbook of residue analytical methods for veterinary drugs in food. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Cheongju, pp. 3-4 (2014).
20. Tölgyesi A., Tölgyesi L., Sharma V.K., Sohn M., Fekete J.: Quantitative determination of corticosteroids in bovine milk using mixed-mode polymeric strong cation exchange solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**, 919-928 (2010).
21. Caretti F., Gentili A., Ambrosi A., Rocca L.M., Delfini M., Di Cocco M.E., D'Ascenzo G.: Residue analysis of glucocorticoids in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 2477-2490 (2010).
22. Sun H., Kang Z., Li H., Zhang J., Lv Y.: Quantitative determination and confirmation of five synthetic glucocorticoid residues in milk powder by gel permeation chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal. Methods.* **5**, 643-650 (2012).