pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 4, pp. 298~309 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.4.298

**Journal of Food Hygiene and Safety**
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

# 식품 중 안나토색소 분석법 최적화 연구

**이지연[1†] · 박주희[1†] · 이지현[1] · 서희재[2] · 이찬[1]***
[1]중앙대학교 식품공학과, [2]선문대학교 식품과학과

# Optimization of Analytical Method for Annatto Pigment in Foods

Jiyeon Lee[1†], Juhee Park[1†], Jihyun Lee[1], Hee-Jae Suh[2], Chan Lee[1]*
[1]*Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong, Korea*
[2]*Department of Food Science, Sun Moon University, Asan, Korea*

(Received July 5, 2021/Revised August 10, 2021/Accepted August 11, 2021)

**ABSTRACT -** In this study we sought to develop a simultaneous analysis method for *cis*-bixin and *cis*-norbixin, the main components, to detect annatto pigment in food. To establish the optimal test method, the HPLC analysis methods of the European Food Safety Authority (EFSA), Japan's Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW), and National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS) were compared and reviewed. In addition, a new pretreatment method applicable to various foods was developed after selecting conditions for simultaneous high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis in consideration of linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and analysis time. The HPLC analysis method of NIFDS showed the best linearity ($R^2 \geq 0.999$), exhibiting low detection and quantification limits for *cis*-norbixin and *cis*-bixin as 0.03, 0.05 μg/mL, and 0.097, 0.16 μg/mL, respectively. All previously reported pretreatment methods had limitations in various food applications. However, the new pretreatment method showed a high recovery rate for all three main food groups of fish meat and meat products, processed cheese and beverages. This method showed an excellent simultaneous recovery rate of 98% or more for *cis*-bixin and *cis*-norbixin. The HPLC analysis method with a new pretreatment method showed high linearity with a coefficient of determination ($R^2$) of 1 for both substances, and the accuracy (recovery rate) and precision (%RSD) were 98% and between 0.4-7.9, respectively. From this result, the optimized analytical method was considered to be very suitable for the simultaneous analysis of *cis*-bixin and *cis*-norbixin, two main components of annatto pigment in food.

**Key words :** Bixin, Norbixin, Annatto, HPLC analysis, Method validation

식품에 노란색에서 붉은 색을 부여하는 첨가물인 안나토색소는 주로 중남미 및 동아프리카에서 발견되는 *Bixa orellana* Linné 씨앗인 안나토의 외피를 원료로 추출하여 얻어지며, bixin과 norbixin을 주요 색소 성분으로 갖는다[1-3]. 유럽식품안전청(European Food Safety Authority, EFSA)[4]에 따르면, 안나토의 주요 색소 성분인 *cis*-bixin은 카로티노이드의 일종으로써 안나토 전체 카로티노이드 함량의 80% 이상을 차지한다. *Trans*-bixin과 norbixin은 안나토에서 적은 양을 차지하며, norbixin의 경우 전체 색소 성분의 5% 미만이다. *Cis*-bixin은 대부분의 유기용매에 용해되며, *cis*-norbixin은 극성 용매에 용해된다[1,5,6]. *Cis*-bixin은 특정 온도 및 pH 조건 하에서 *cis*-norbixin으로 가수분해될 수 있으며, 칼륨 혹은 소듐염을 생성할 수 있다[7] (Fig. 1).

안나토색소는 성분에 따라 *cis*-bixin이 주성분인 경우 유용성 색소(E 160 b(i)), 그리고 *cis*-norbixin이 주성분인 경우 수용성 색소(E 160 b(ii))로 구분된다[4,7]. 국제 식품첨가물 전문가 위원회(FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA)[8]는 제조법을 기준으로 안나토색소를 Annatto B, C, D, E, F, G의 6개로 세분화하였으나, 현재는 Annatto D를 제외한 5개 제품들이 식품 첨가물로서 사용이 인정된다[4]. JECFA[9]에서는 안나토색소를 크게 Annatto extracts, bixin-based (160b(i))와 Annatto extracts, norbixin-based (160b(ii))로 나누고 있으며, 이는 Annatto E

†These authors contributed equally to this work.
*Correspondence to: Chan Lee, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong, 17546, Korea
Tel:+82-31-670-3031, Fax: +82-676-8865
E-mail: chanlee@cau.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

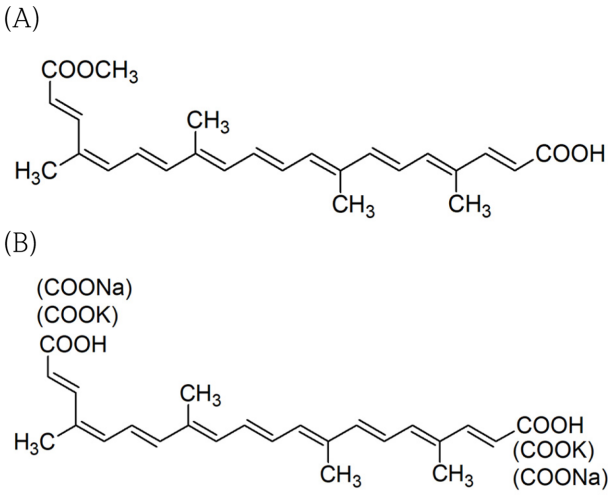


**Fig. 1.** Chemical structure of (A)*cis*-bixin, and (B)*cis*-norbixin and its disodium and dipotassium salts.

(Aqueous-processed bixin), Annatto B (Solvent-extracted bixin)와 Annatto F (Alkali-processed norbixin, acid precipitated), Annatto G (Alkali-processed norbixin, not acid precipitated), Annatto C (Solvent-extracted norbixin)로 각각 세분화되어 있다. 안나토색소는 버터, 츄잉검, 제과류, 베이커리제품의 토핑 등에 사용되며, 사용가능식품과 사용량은 bixin과 norbixin 기반 색소에 서로 다르게 설정되어 있다. 안나토색소의 일일섭취허용량(Acceptable daily intake, ADI)은 색소의 총량이 아닌 bixin과 norbixin의 양을 기반으로 하며, bixin의 ADI는 0-12 mg/kg body weight (b.w.)이고 norbixin과 그 칼륨 및 소듐염은 0-0.6 mg/kg b.w.로 설정되어 있다[10]. 식품첨가물로서 안나토색소는 국가별로 서로 다른 기준을 따른다. EFSA[11]의 2020년 개정안에 따르면, 현재 유럽연합은 안나토색소를 alkali-extracted annatto (E160b(ii)), oil-extracted annatto (E160b(iii)), solvent-extracted bixin and norbixin (E160b(i))로 나누던 기존의 분류체계에서 벗어나 JECFA와 일치하는 분류체계를 유지하고 있다. 사용 기준 역시 JECFA와 마찬가지로 식품별로 bixin 또는 norbixin을 기반으로 하는 색소의 양으로 각기 설정 되어있다. 하지만 우리나라[12,13]에서는 bixin 또는 norbixin을 기반으로 하는 안나토색소(Annatto extract)와 norbixin의 칼륨염과 소듐염을 기반으로 하는 수용성안나토(Annatto, Water-soluble)의 두 가지로 구분하고 있으며, 이는 일본[14]의 분류체계와 일치한다.

국내외 안나토색소의 식품첨가물 지정 기준이 상이하기에 수입식품의 성분 표기에서 혼동이 발생할 수 있다. 안나토색소 및 수용성안나토는 기본적으로 bixin 및 norbixin의 구성 비율에 따라 구분되므로, 수입식품 중 사용된 색소의 정확한 판단을 위하여 두 가지 색소 성분을 동시에 정량할 수 있는 분석법이 요구된다.

식품 중 안나토색소를 분석하는 방법은 EU[7], 일본[15], 한국[16] 등에서 보고된 바 있으며, 대부분의 분석이 HPLC-Photodiode-Array Detector (PDA)를 이용하여 수행되었다. 국내외에서 많은 분석법들이 보고되었지만 식품 중 bixin 또는 norbixin을 기반으로 하는 안나토색소의 양을 결정하기 위하여, 보다 정확하고 간단한 분석법이 요구되어왔다. 따라서 본 연구에서는 국내외의 안나토색소 HPLC 분석법과 전처리법을 비교 및 검토하고 개선함으로써 식품 중 *cis*-bixin과 *cis*-norbixin의 동시 분석법을 최적화하였으며, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀도, 정확도, 회수율, 실험실간 교차검증을 수행함으로써 방법을 검증하였다.

## Materials and Methods

### 시약 및 재료

본 실험에 사용된 bixin과 norbixin은 FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. HPLC용 메탄올, 물, 헥산, 아세토니트릴, 에탄올은 Honeywell Burdick & Jackson (Ulsan, Korea) 제품이며, 아세트산, 1 M 수산화나트륨, 암모니아수(28%)는 Samchun Chemical Co., Ltd. (Pyeontaek, Korea)로부터 구매하였다. 포름산은 Thermo Fisher Scientific (Madrid, Spain)로부터 구입하여 사용하였으며, 0.5 N 염산, 진한 염산, 클로로포름, 에틸아세테이트는 Duksan Pure Chemical (Ansan, Korea) 제품이다. 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), 6-*o*-palmitoyl-L-ascorbic acid (ascorbyl palmitate)는 Tokyo Chemical Industry (Saitama, Japan)에서 구매되었으며, Sep-Pak Vac 6 cc (1 g) Silica Cartridge는 Waters (Milford, MA, USA)의 제품이다. Celite 545 (filter-aid)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

### 식품 분석

국내 제조 식품 20개, 수입 식품 13개와 포르투갈 현지 유통 식품 3개를 구입하여 본 연구에서 확립된 분석법의 식품시료에 대한 적용을 검토하였다. 수집된 식품들을 4가지(어육 및 육가공품, 가공치즈, 음료, 기타)로 분류하였으며, 확립된 방법으로 안나토색소 함량을 분석하였다.

### 기기조건

Diode Array Detector (Agilent 1200 series)가 장착된 고성능액체크로마토그래피(HPLC, Agilent 1260 infinity system, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)로 bixin과 norbixin을 분석하였다. Eclipse XDB-$C_{18}$ (4.6 × 150 mm, particle size 5 μm, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) 컬럼을 사용하였으며, *cis*-norbixin과 *cis*-bixin의 동시분석법 최적화를 위하여 유럽, 일본, 한국의 분석법을 비교, 적용하여 최적방법을 도출하였다. 분석에

**Table 1.** The conditions of HPLC methods from EFSA[4,5,17], MHLW[15], and NIFDS[16]

| | HPLC method 1[5] | HPLC method 2[17] | HPLC method 3[15] | HPLC method 4[16] |
|---|---|---|---|---|
| Stationary phase | Agilent Eclipse XDB-$C_{18}$ (4.6 × 150 mm, particle size 5 μm) | | | |
| Column temp. | 35°C | 25°C | 25°C | 35°C |
| Mobile phase | A: 0.4% Aqueous acetic acid<br>B: Acetonitrile<br>A : B = 35 : 65 | A: 0.1% Aqueous formic acid<br>B: Acetonitrile<br>Time / A% / B%<br>0 / 20 / 80<br>10 / 5 / 95<br>15 / 0 / 100<br>20 / 20 / 80 | Methanol:water: acetic acid (85:14:1) | A: 2% Aqueous acetic acid<br>B: Methanol<br>A : B = 15 : 85 |
| Detection wavelength | 455, 10 nm (Reference wavelength 600, 4 nm) | 458, 9 nm<br>486, 9 nm | 454 nm | 495 nm |
| Flow rate | 1 mL/min | | | |
| Injection vol. | 10 μL | | | |
| Run time | 20 min | 30 min | 15 min | 15 min |

**Table 2.** The conditions of LC-(ESI)-MS/MS

| Parameters | Conditions | |
|---|---|---|
| Column | Agilent Eclipse XDB-$C_{18}$ (4.6 × 150 mm, particle size 5 μm) | |
| Temperature | 35°C | |
| Mobile phase | A: 0.3% Aqueous formic acid,<br>B: Methanol<br>A : B= 20 : 80 | |
| Detector | Mode | ESI positive mode |
| | Spray voltage | 5.0 kV |
| | Aux gas | 5 |
| | Sheath gas | 35 |
| | Capillary temp. | 275? |
| Flow rate | 1 mL/min | |
| Injection vol. | 20 μL | |
| Run time | 35 min | |

사용된 각 HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, LTQ Velos Pro series, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)는 *cis*-bixin과 *cis*-norbixin의 정성분석을 위해 이용되었다(Table 2).

### 표준용액 조제

Bixin과 norbixin을 각각 10 mg을 취한 뒤 메탄올에 1 mg/mL의 농도로 녹인 후, 50°C에서 4시간 동안 초음파처리하여 표준원액으로 제조하였다. 이 표준원액을 메탄올로 1-50 μg/mL의 농도로 희석하여 검량선 작성을 위한 *cis*-bixin과 *cis*-norbixin 표준용액으로 하였다.

### 전처리법

식품 중에 함유된 *cis*-bixin과 *cis*-norbixin의 최적 전처리법을 확립하기 위하여 유럽식품안전청[5,17], 일본후생노동성[15], 식품의약품안전평가원[16]의 안나토색소 및 수용성안나토 분석법을 재현 및 비교하였다. 시료를 어육 및 육가공품, 가공 치즈, 음료의 세 종류로 분류하였으며, 균질화된 시료를 취하여 각 방법에 따라 전처리한 후 결과를 비교하였다. 기존 전처리법 및 확립된 전처리법은 Fig. 2에 정리하였다.

전처리법 1의 경우 유럽식품안전청[5]에서 채택한 방법으로, 어육 및 육가공품, 치즈, 음료를 각각 다른 방법으로 전처리한 뒤 분석을 진행한다. 다른 방법과 달리 규조토를 사용하는 특징이 있으며, 이는 샘플의 균질화에 도움을 준다. 어육 및 육가공품 시료에 대해서 추출용액에 존재하는 소량의 염산은 식품으로부터의 색소 추출을 촉진하고, 염기를 중화하는 역할을 한다. 지방의 제거를 위해 헥산이 사용되었으며, 원심분리는 헥산과 지방의 혼합물을 용이하게 제거하기 위한 단계이다. 전처리법 2도 유럽식품안전청[17]에서 채택한 방법이며, 문헌에서는 육가공품을 대상으로 확립된 전처리법을 보고하였으나 본 연구에서는 그룹화한 식품군에 대한 균일한 비교를 위하여 세 식품군에 동일하게 적용하였다. 전처리법 3은 일본 후생노동성[15]에서 사용하는 방법으로써, 세 식품군에 대해서

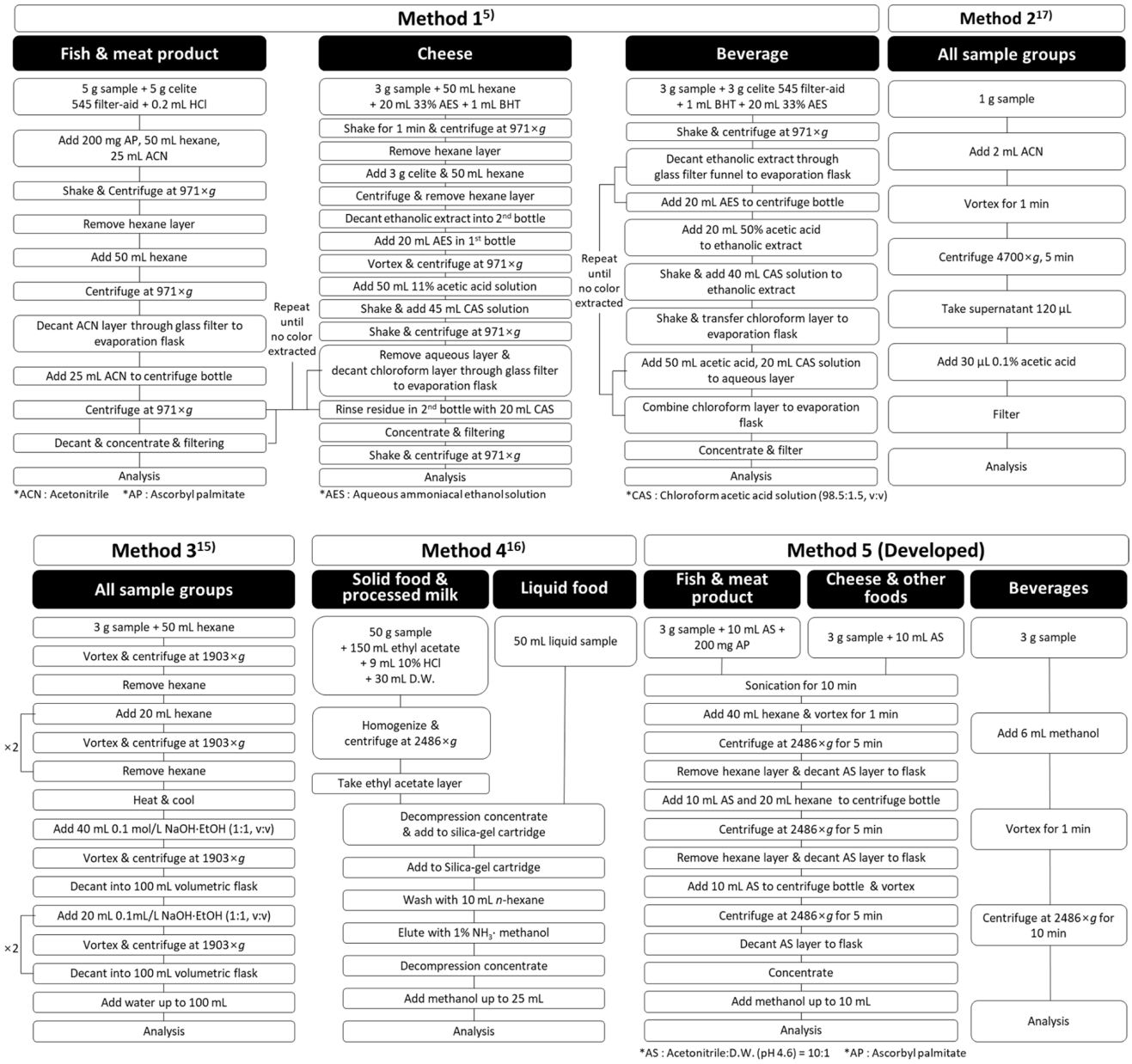


**Fig. 2.** Pretreatment methods for extraction of *cis*-bixin and *cis*-norbixin in foods.

균일하게 적용되나 전처리법 2에 비해 더 많은 단계의 추출 및 정제과정을 거친다. 헥산을 사용한 지방 제거 과정을 포함하고 있으며, 0.1 mol/L 수산화나트륨과 에탄올 혼합용액을 추출용액으로 사용한다. 전처리법 4의 경우 우리나라의 식품의약품안전평가원[16)]에서 보고된 방법으로, 햄, 소시지 및 과자 등의 고형상 검체 및 유음료에 적용할 수 있고 초산에틸, 염산, 증류수를 사용한 추출과정 이후에 실리카겔 카트리지를 사용한 정제과정을 특징으로 한다.

전처리법 5는 기존 전처리법들을 재현한 결과를 바탕으로 시료로부터 색소를 가장 효율적으로 추출할 수 있도록 고안한 방법이다. 세 식품군에 서로 다른 전처리법을 적용 후 최적조건을 확립하였으며, 카로티노이드와 지방의 항산화 메커니즘의 유사성 때문에 지방과 오일의 효과적인 항산화제로써 사용되는 아스코빌팔미테이트를 사용함으로써[5)] 색소 성분이 빛에 의해 파괴되는 것을 지연시켰다.

## 분석법 타당성 검증

분석법의 타당성을 검증하기 위해 직선성, LOD, LOQ, 회수율, 정확도, 정밀도, 실험실간 교차검증 등을 산출하였다[18)].

*Cis*-bixin과 *cis*-norbixin의 표준용액 1, 5, 10, 20, 50 μg/mL과 바탕시료에 *cis*-bixin과 *cis*-norbixin을 첨가한 용액 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 μg/mL를 HPLC로 3반복 측정하여 검량선을 작성하고, 결정계수 ($R^2$)값으로 직선성을 확

인하였다. 그리고 *cis*-bixin과 *cis*-norbixin을 바탕시료에 용해시켜 제조된 용액(1.25, 2.5, 5 μg/mL)을 분석하여 구한 검량선의 기울기(S)와 중간농도 2.5 μg/mL를 7반복 분석하여 얻은 표준편차(σ)를 이용하여 검출한계와 정량한계를 산출하였다[18].

$$LOD = 3.3 \times \sigma/S$$
$$LOQ = 10 \times \sigma/S$$

(σ: 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

정확도와 정밀도는 일내 및 일간 분석 시험을 통해 산출되었다. 일내 분석 시험을 위해 *cis*-bixin 및 *cis*-norbixin 표준품 7.5, 15, 30 μg/g를 바탕시료(어육 및 육가공품, 치즈 및 기타식품, 음료)에 첨가하여 전처리한 후 하루에 5회 반복 분석하였고, 일간 시험을 위해 동일한 실험을 하루 1회 3일간 반복하였다. 정확도는 일내 및 일간 분석 시험 결과들의 이론상 농도와 실측하여 구한 농도를 비교하여 나타냈고, 정밀도는 결과의 평균과 표준편차를 이용하여 상대 표준편차(%RSD)로 산출하였다. 실험실간 교차검증은 3개 실험실에서 같은 농도 및 조건으로 제조된 시료를 3반복 분석함으로써 진행하였으며, 결과값의 RSD (%)를 산출하여 확인하였다.

### 통계분석

본 연구에서 얻은 모든 분석 결과는 엑셀을 이용하여 산술평균, 표준오차, 상대 표준편차 등을 산출하였다.

## Results and Discussion

### HPLC 분석법 비교

*Cis*-bixin과 *cis*-norbixin의 최적 동시 분석을 위해 유럽식품안전청[5,17](HPLC 분석법 1, 2), 일본 후생노동성[15](HPLC 분석법 3), 식품의약품안전평가원[16](HPLC 분석법 4)의 분석법을 재현하였으며, Fig. 3과 같이 *cis*-norbixin과 *cis*-bixin이 잘 분리되었음을 확인할 수 있었다. 모든 분석법 재현 결과에서 *cis*-norbixin이 먼저 검출되고 이후에 *cis*-bixin이 검출되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3).

HPLC 분석법 1[5]을 적용 시, 보고된 것보다 짧은 길이의 컬럼이 실험에 사용되어 약 5분 더 이른 시간에 피크가 검출되었다. 검출된 피크의 height/width ratio는 비교된 방법들 중에 가장 낮았으며, 검출한계와 정량한계는 *cis*-norbixin의 경우 각각 0.08 μg/mL과 0.24 μg/mL였고, *cis*-bixin의 경우 0.02 μg/mL와 0.06 μg/mL이었다(Table 3). HPLC 분석법 2[17]의 경우, 장비에 고압을 가해 적절하지 않다고 판단된 원래 컬럼과 다른 컬럼을 사용하였지만, 머무름 시간은 기존 컬럼을 사용하여 보고된 결과와 유사하게 나타났다. 결과 피크는 다른 분석법들에 비해 가장 이른 머무름 시간을 보였으나 전체 분석시간은 가장 길었으며, *cis*-norbixin과 *cis*-bixin 피크가 검출되기 직전에 다른 피크들이 검출되어 간섭의 가능성이 있었다(Fig. 3 (B)). HPLC 분석법 3[15]과 4[16]는 비슷하게 양호한 결과를 보였지만 결과적으로 분석법 4가 최적의 HPLC 분석법으로 나타났다. 분석법 4는 분석시간을 줄이기 위해 더 짧은 컬럼을 적용하였으며, 이에 따라 분석 시간이 짧고 검량선의 결정계수($R^2$)가 1로 가장 높았으며, 특히 *cis*-norbixin의 검출한계와 검량한계는 시험한 다른 분석법들보다 낮아 우수하였다(Table 3). 유통 식품 분석을 위해 수집한 식품들에 표기된 내용을 참고하였을 때, norbixin 기반의 수용성 안나토가 안나토색소보다 식품에 더 많이 사용되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 HPLC method 4를 최적 분석법으로 선정하는데 있어서 *cis*-bixin의 검출한계 및 검량한계

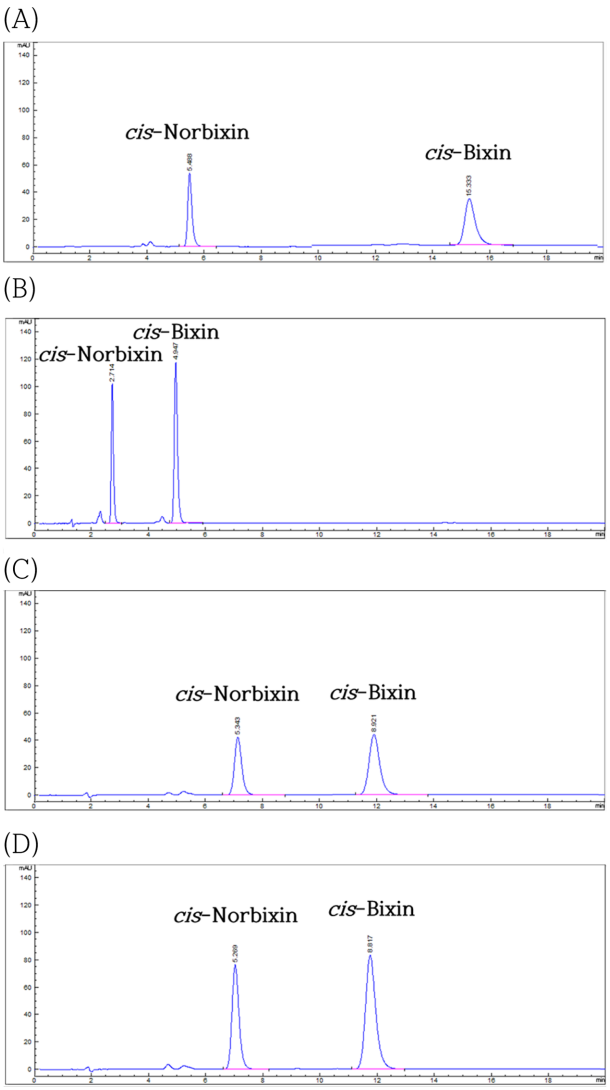


**Fig. 3.** HPLC chromatograms of (A) HPLC method 1[5], (B) HPLC method 2[17], (C) HPLC method 3[15], and (D) HPLC method 4[16].

**Table 3.** The comparison of the *cis*-norbixin and *cis*-bixin in HPLC chromatogram

| Parameters | | HPLC method 1[5] | HPLC method 2[17] | HPLC method 3[15] | HPLC method 4[16] |
|---|---|---|---|---|---|
| Run time (min) | | 20 | 30 | 15 | 15 |
| norbixin/ bixin | Retention time (min) | 5.49/15.35 | 2.71/4.95 | 5.34/8.93 | 5.27/8.82 |
| | Height (mAU) | 112.69/67.86 | 212.08/236.14 | 87.69/88.11 | 76.62/83.44 |
| | Width (min) | 0.16/0.39 | 0.08/0.12 | 0.21/0.3 | 0.19/0.27 |
| | Height/Width ratio | 11.74/2.87 | 42.08/32.71 | 7.18/4.91 | 6.51/4.82 |
| | LOD (μg/mL) | 0.08/0.02 | 0.04/0.04 | 0.04/0.01 | 0.03/0.05 |
| | LOQ (μg/mL) | 0.24/0.06 | 0.11/0.11 | 0.11/0.02 | 0.097/0.16 |
| | Linearity ($R^2$) | 1/1 | 0.9999/0.9997 | 0.9999/1 | 1/1 |

**Table 4.** Comparison of recoveries of *cis*-norbixin and *cis*-bixin in various pretreatment conditions

| Method | Matrix | Recovery±SD (%) | |
|---|---|---|---|
| | | *cis*-norbixin | *cis*-bixin |
| Method 1[5] | Fish·meat product | 78.6±0.08 | 83.9±0.3 |
| | Processed cheese | 2.5±0.3 | 54.7±0.5 |
| | Beverage | 41.9±1.6 | 46.1±0.5 |
| Method 2[17] | Fish·meat product | 46.6±0.5 | 73.2±0.3 |
| | Processed cheese | 66.7±0.2 | 71.9±0.2 |
| | Beverage | 95.1±1.1 | 99.8±0.1 |
| Method 3[15] | Fish·meat product | 85.2±2.2 | - |
| | Processed cheese | 87.1±0.7 | - |
| | Beverage | 98.6±3.5 | - |
| Method 4[16] | Fish·meat product | 59.3±0.0 | 68.5±0.0 |
| | Processed cheese | 77±0.4 | 42.1±0.0 |
| | Beverage | 43.1±1.0 | 43.4±0.9 |
| Method 5 | Fish·meat product | 98±0.8 | 96.5±0.2 |
| | Processed cheese | 88.4±0.9 | 89.8±0.0 |
| | Beverage | 109±0.3 | 110.1±0.2 |

보다는 *cis*-norbixin의 값이 다른 분석법에 비해 낮은 것을 중요한 기준으로 삼았다.

### *Cis*-bixin과 *cis*-norbixin 전처리법 비교 및 최적화

시중에 유통되고 있는 안나토색소는 식품 중 안나토색소의 총 사용량 추정은 불가능하나, 색소의 주요 구성성분인 cis-bixin 및 cis-norbixin의 각 함량은 계산이 가능하다. 높은 동시 회수율을 갖는 전처리법은 안나토색소 혹은 수용성안나토 사용 여부 판단에 있어서 보다 정확한 결정을 하도록 한다. 전처리법의 비교를 위하여 표준용액을 10 μg/g의 농도로 첨가하였으며, *cis*-bixin과 *cis*-norbixin의 동시분석법 최적화를 통해 선정된 HPLC method 4가 분석을 위해 적용되었다. 회수율 결과는 Table 4와 같이 나타났다.

전처리법 1[5]은 어육 및 육가공품의 경우 78.6% (*cis*-norbixin)와 83.9% (*cis*-bixin)의 회수율을 보였지만, 가공 치즈와 음료에서는 *cis*-norbixin의 회수율이 2.5%, 41.9%, *cis*-bixin은 54.7%와 46.1%로 낮게 나타났다(Table 4). 가공치즈에서의 *cis*-norbixin 회수율은 특히 Scotter 등[5]이 보고한 75-90%보다 낮은 수치였다. 전처리법 2[17]에 의한 어육 및 육가공품의 회수율은 *cis*-norbixin의 경우 46.6%, *cis*-bixin의 경우 73.2%였으며 *cis*-norbixin이 이성질체화 되어 회수율이 낮았다. 가공 치즈에서 *cis*-norbixin과 *cis*-bixin의 회수율은 66.7%와 71.9%였으며, 음료의 회수율은 각각 95.1%와 99.8%로 나타났다(Table 4). 또한, 회수율 시험 중 음료 시료와 아세토니트릴 층이 분리되어 첨가된 표준물질이 아세토니트릴 층으로 추출되는 사례가 있었으며, 이 경우 아세토니트릴층의 부피가 증가함으로써, 회수율을 정확하게 계산하기 위해 다시 부피를 정확하게 측정하는 추가 단계가 필요하였다. 전처리법 3[15]의 경우, 회수율은 어육 및 육가공품, 가공 치즈, 음료에 대해 각각 85.2%,

87.1% 그리고 98.6%로 높게 나타났다(Table 4). 재현된 4가지 전처리법 중 회수율이 가장 높았으나 전처리 과정 중 첨가된 0.1 mol/L 수산화나트륨·에탄올(1:1)용액으로 인해 *cis*-bixin이 *cis*-norbixin으로 전환되어 동시 분석이 불가능하였다. 이는 Oliveira 등[19]이 샘플 전처리 중 추출 과정에서 *cis*-bixin이 *cis*-norbixin으로의 saponification 및 transformation을 보고하였던 것과 같았다. 전처리법 4는 *cis*-norbixin이 43.1-77.0%, *cis*-bixin이 42.1-68.5%의 회수율을 보였으며(Table 4), 이는 에틸아세테이트 및 고상추출에 의한 추출이 불충분한 것으로 추정되었다.

재현된 4가지 전처리법은 모두 최적 전처리법으로 적합하지 않다고 판단되어 개선이 필요하였다. 비교된 4개의 전처리법 중 회수율이 가장 높은 전처리법 3을 기반으로 용매-용질 비율, 추출 용매, 항산화제, 원심분리 조건 등을 개선하여 최적화된 전처리 방법을 개발하였다(Fig. 2). 미국 식품의약국(FDA)[20]에 의하면 정량 시험에서 10 ppm 농도의 회수율 허용 기준은 80-110%이다. 최종 최적화된 전처리법은 시험한 식품 매트릭스에서 *cis*-norbixin이 88.4-109.0%, *cis*-bixin은 89.8-110.1%의 회수율을 보였으므로, 어육 및 육가공품, 가공 치즈, 음료에서 *cis*-norbixin과 *cis*-bixin의 동시 분석에 적합하다고 판단되었다.

### 최적 시험법 검증

시험법 검증은 시험법이 의도한 목적에 적합하다는 것을 입증하거나 확인하는 과정으로[20], 식품군에 따라 다른 전처리법이 최적화되었기에 어육 및 육가공품, 가공 치즈, 음료의 세 가지 식품 매트릭스에서 검증이 수행되었다. 본 연구에서 선택된 HPLC 분석법(HPLC method 4) 및 새로

**Table 5.** Linearity, LOD, and LOQ of *cis*-norbixin and *cis*-bixin in food matrix

| Parameter | *cis*-norbixin | | | *cis*-bixin | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fish·meat product | Processed cheese | Beverage | Fish·meat product | Processed cheese | Beverage |
| $R^2$ | 1 | 0.9998 | 0.9998 | 1 | 0.9998 | 0.9999 |
| LOD (μg/mL) | 0.07 | 0.04 | 0.1 | 0.12 | 0.02 | 0.08 |
| LOQ (μg/mL) | 0.2 | 0.12 | 0.29 | 0.36 | 0.07 | 0.25 |

**Table 6.** Precision and accuracy from the intra-and inter-day tests

| | | Intra-day (n=5) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Conc. of *cis*-norbixin (μg/g) | | | Conc. of *cis*-bixin (μg/g) | | |
| Food category | | 7.5 | 15 | 30 | 7.5 | 15 | 30 |
| Fish·meat product | Mean±SD (μg/g) | 6.9±0.1 | 13.7±0.2 | 28.5±0.2 | 6.5±0.1 | 13.3±0.2 | 27.8±0.5 |
| | Precision (%RSD) | 1.4 | 1.7 | 0.8 | 2.1 | 1.7 | 2.0 |
| | Accuracy (%) | 92.5 | 91.6 | 95.1 | 87 | 88.9 | 92.6 |
| Processed cheese | Mean±SD (μg/g) | 7.4±0.1 | 13.7±0.5 | 26±1.4 | 7.2±0.1 | 13.9±0.3 | 27.4±1.0 |
| | Precision (%RSD) | 1.8 | 4.0 | 5.5 | 1.4 | 2.1 | 3.7 |
| | Accuracy (%) | 98.9 | 91.1 | 86.5 | 95.9 | 92.8 | 91.2 |
| Beverage | Mean±SD (μg/g) | 7.9±0.1 | 15.5±0.2 | 30.7±0.3 | 7.8±0.2 | 15.1±0.1 | 29.5±0.5 |
| | Precision (%RSD) | 1.6 | 1.6 | 0.9 | 2.3 | 1.0 | 1.6 |
| | Accuracy (%) | 105.9 | 103.5 | 102.5 | 104.5 | 100.9 | 98.2 |
| | | Inter-day (n=3) | | | | | |
| Fish·meat product | Mean±SD (μg/g) | 7.0±0.9 | 13.8±1.0 | 28.5±1.1 | 6.7±1.2 | 13.5±1.2 | 28.3±0.9 |
| | Precision (%RSD) | 0.9 | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 0.9 |
| | Accuracy (%) | 93.2 | 91.9 | 95.1 | 89.1 | 89.9 | 94.4 |
| Processed cheese | Mean±SD (μg/g) | 7.5±0.0 | 14.4±0.2 | 26.6±0.3 | 7.3±0.1 | 13.5±0.2 | 28±0.3 |
| | Precision (%RSD) | 0.5 | 1.3 | 1.1 | 1.5 | 1.3 | 1.2 |
| | Accuracy (%) | 100 | 95.7 | 88.5 | 97.6 | 89.8 | 93.2 |
| Beverage | Mean±SD (μg/g) | 8.0±0.2 | 15.3±0.1 | 29.9±1.7 | 7.9±0.3 | 15±0.1 | 29.8±2.4 |
| | Precision (%RSD) | 3.1 | 0.4 | 5.8 | 3.6 | 0.7 | 7.9 |
| | Accuracy (%) | 106.2 | 101.3 | 99.6 | 105.6 | 100.1 | 99 |

**Table 7.** The results of the inter-laboratory test

| | Food category | Conc. (μg/g) | Laboratory A | | Laboratory B | | Laboratory C | | %RSD | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *cis*-norbixin | *cis*-bixin | *cis*-norbixin | *cis*-bixin | *cis*-norbixin | *cis*-bixin | *cis*-norbixin | *cis*-bixin |
| Accuracy (%) | Fish·meat products | 7.5 | 92.5 | 87.0 | 89.4 | 86.5 | 98.3 | 95.7 | 3.1 | 6.6 |
| | | 15 | 91.6 | 88.9 | 97.6 | 97.4 | 97.7 | 95.7 | 4.8 | 1.1 |
| | | 30 | 95.1 | 92.6 | 96.7 | 96.3 | 97.0 | 92.9 | 2.2 | 2.3 |
| | Processed Cheese | 7.5 | 98.9 | 95.9 | 99.1 | 101.8 | 98.3 | 96.7 | 1.8 | 2.6 |
| | | 15 | 91.1 | 92.8 | 95.6 | 96.6 | 97.6 | 96.3 | 2.4 | 0.7 |
| | | 30 | 86.5 | 91.2 | 96.8 | 94.8 | 95.9 | 95.5 | 5.6 | 0.6 |
| | Beverage | 7.5 | 105.9 | 104.5 | 100.0 | 101.9 | 103.6 | 101.7 | 3.0 | 1.0 |
| | | 15 | 103.5 | 100.8 | 103.0 | 103.4 | 107.1 | 103.5 | 1.4 | 2.0 |
| | | 30 | 102.5 | 98.2 | 103.1 | 100.1 | 105.4 | 100.8 | 2.6 | 2.8 |
| Precision (%RSD) | Fish·meat products | 7.5 | 1.4 | 2.1 | 3.5 | 3.3 | 0.6 | 1.1 | - | - |
| | | 15 | 1.7 | 1.7 | 2.6 | 1.7 | 0.6 | 0.2 | - | - |
| | | 30 | 0.8 | 2.0 | 0.6 | 1.8 | 0.3 | 0.7 | - | - |
| | Processed Cheese | 7.5 | 1.8 | 1.4 | 3.4 | 3.3 | 0.4 | 0.9 | - | - |
| | | 15 | 4.0 | 2.1 | 0.9 | 1.7 | 0.9 | 0.4 | - | - |
| | | 30 | 5.5 | 3.7 | 0.4 | 0.6 | 0.3 | 0.3 | - | - |
| | Beverage | 7.5 | 1.6 | 2.3 | 1.3 | 0.5 | 0.9 | 2.0 | - | - |
| | | 15 | 1.6 | 1.0 | 1.1 | 2.5 | 0.7 | 1.2 | - | - |
| | | 30 | 0.9 | 1.6 | 0.6 | 1.1 | 0.6 | 0.5 | - | - |

확립된 전처리법(Method 5)의 직선성, 검출한계, 검량한계는 Table 5와 같으며, *cis*-norbixin과 *cis*-bixin의 검출한계는 Bareth 등[21]이 보고한 0.15 mg/kg보다 낮은 값이었다. 일간 정밀도(%RSD)의 경우, *cis*-norbixin은 0.4-5.8, *cis*-bixin은 0.7-7.9이었으며, 일간 정확도(%)는 *cis*-norbixin은 88.5-106.2%, *cis*-bixin은 89.1-105.6%이었다. 일내 정밀도(%RSD)는 *cis*-norbixin은 0.8-5.5, *cis*-bixin은 1.0-3.7이었고, 정확도(%)는 *cis*-norbixin은 86.5-105.9%, *cis*-bixin은 87.0-104.5%로 나타났다(Table 6). 3개 실험실 간 교차검증 결과 *cis*-norbixin의 정확도(%)는 86.5-107.1%, *cis*-bixin의 경우 86.5-104.5%이었으며, 회수율에 대한 상대표준편차값은 각 1.4-5.6과 0.6-6.6로 우수한 결과를 보였다. 정밀도(%RSD)는 *cis*-norbixin의 경우 0.3-5.5이었으며, *cis*-bixin의 경우 0.2-3.7로 역시 우수한 결과를 보였다. 교차검증 결과, 정확도의 정밀도는 모두 식품첨가물 시험법의 검증범위를 만족한다(Table 7).

### *Cis*-norbixin과 *cis*-bixin의 $MS^2$ 패턴 비교

*Cis*-norbixin과 *cis*-bixin 표준물질을 분석한 크로마토그램은 Fig. 4와 같이 나타났다. *Cis*-norbixin의 피크는 10.8분에 검출되었으며, *cis*-bixin은 19.9분에 검출되었다. 두 물질 모두 positive ion mode에서 결과가 분석되었으며 381 *m/z*과 395 *m/z*의 분자량을 보였다. *Cis*-norbixin의 product ion은 363, 345, 335, 321, 281 *m/z*이었고, *cis*-bixin의 product ion은 377, 363, 345, 335, 317 *m/z*으로 Noppe 등[17]이 보고한 값과 일치하였다. 또한, van Scheppingen 등[22]은 *cis*-norbixin이 negative mode에서 379 *m/z*를 보였음을 보고하였으며, Breithaupt 등[23]은 positive mode에서 *cis*-norbixin이 381 *m/z*를 보였음을 보고하였으며 이러한 결과는 본 실험의 결과와 동일하였다.

### 유통 식품 분석

본 연구에서 선택된 HPLC 분석법(HPLC method 4)과 새로 확립된 전처리법(Method 5)을 적용하여 식품 샘플 36개를 분석한 결과 36개 샘플에서 *cis*-bixin이나 *cis*-norbixin이 검출되었으며, 검출 범위는 *cis*-norbixin은 N.D. (not detected)-24.18 μg/g, *cis*-bixin은 N.D.-11.21 μg/g이었다. *Cis*-norbixin은 어육 및 육가공품, 음료, 과자, 버터 및 마가린에서 10 μg/g 미만에서 검출되었으며, *cis*-bixin은 어육 및 유가공품과 음료에서는 검출되지 않았고 가공치즈 샘플 1개에서 10 μg/g 초과 검출되었다. HPLC 결과 검증을 위해 식품첨가물용 안나토색소와 수용성안나토, 그리고 유통 샘플 4개를 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 식품첨가물용으로 유통되는 안나토색소 및 수용성안나토에서 *cis*-norbixin이 검출되었다(Fig. 5 (A), (B)). Fig. 5 (C)는 식품 성분 표시에 수용성안나토가 표기된 수입 식품

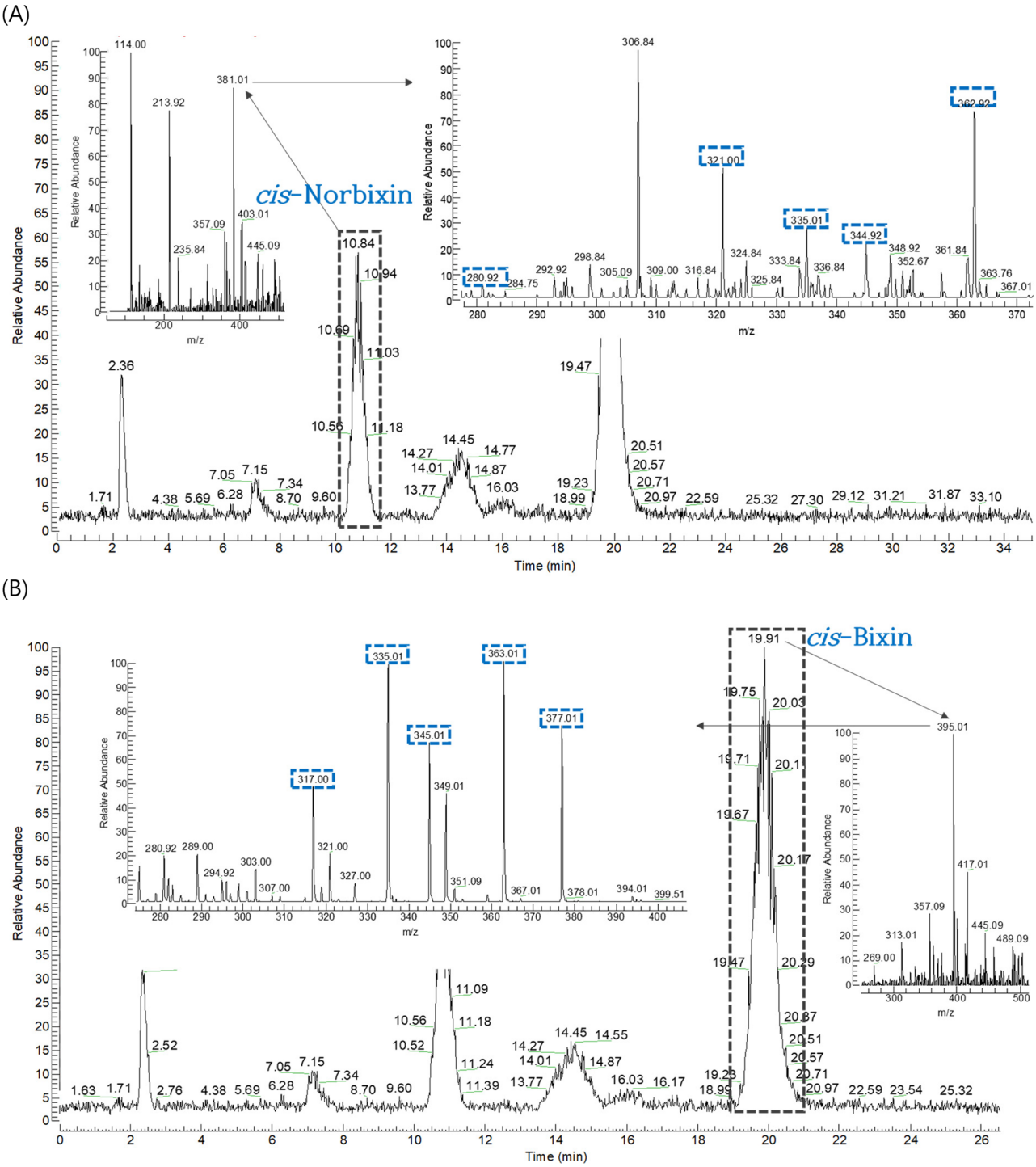


**Fig. 4.** Extracted ion chromatogram (EIC) and MS/MS spectrum of *cis*-norbixin (381 *m/z*) and *cis*-bixin (395 *m/z*).

(치즈)의 분석결과로써, HPLC 분석에서 *cis*-bixin peak가 검출되었으며 LC-MS/MS를 이용한 검증에서 동일한 결과를 보였다. 그 외에도 수용성 안나토 및 안나토색소가 표기된 식품 3종의 경우 *cis*-norbixin이 존재함이 확인되었고, Fig. 5 (D)-(F)와 같이 그 결과가 나타났다. 이 결과들과 비슷하게 Scotter 등[5]이 보고한 식품 중 안나토색소 측정치는 n.d-37.5 mg/kg이었으며, Oliveira 등[19]은 압출성형 스낵에서 0.2-15.5 mg/kg의 norbixin을, Lancaster와 Lawrence[24]는 치즈에서 norbixin 1.1-68.8 μg/g과 bixin N.D.-5.9 μg/g이 검출되었음을 보고했다. 유통 식품 분석 결과와 선행 연구들의 결과를 함께 고려했을 때 식품 중 norbixin 및 bixin 함량은 다양하게 나타난다. 이상의 결과에서 식품 중

**Table 8.** Monitoring results for food containing annatto extract or water-soluble annatto

| | Sample No. | *cis*-norbixin (μg/g) | *cis*-bixin (μg/g) |
|---|---|---|---|
| Fish·meat products | 1 | 0.61±0.01 | 0.19±0.01 |
| | 2 | 0.72±0.00 | N.D. |
| | 3 | N.D. | N.D. |
| | 4 | 1.54±0.02 | N.D. |
| | 5 | 7.52±0.41 | N.D. |
| | 6 | 0.84±0.09 | N.D. |
| | 7 | 3.21±0.10 | N.D. |
| | 8 | 4.01±0.14 | N.D. |
| | 9 | 1.58±0.05 | N.D. |
| Processed cheese | 11 | 5.37±0.23 | N.D. |
| | 12 | N.D. | N.D. |
| | 13 | N.D. | 3.01±0.06 |
| | 14 | N.D. | 7.48±0.04 |
| | 15 | 2.67±0.06 | 11.21±0.21 |
| | 16 | N.D. | N.D. |
| | 17 | 7.02±0.14 | N.D. |
| | 18 | 20.18±0.88 | N.D. |
| | 19 | 11.99±0.31 | N.D. |
| | 20 | 5.81±0.18 | N.D. |
| | 21 | 6.16±0.33 | N.D. |
| | 22 | 24.18±0.58 | N.D. |
| Beverage | 31 | 3.77±0.04 | N.D. |
| | 32 | 2.46±0.05 | N.D. |
| | 33 | 1.40±0.01 | N.D. |
| | 34 | 0.59±0.01 | N.D. |
| Other food | 41 | 0.12±0.01 | 3.13±0.02 |
| | 42 | 0.08±0.00 | 3.15±0.01 |
| | 43 | 1.22±0.01 | 0.78±0.01 |
| | 44 | 0.30±0.01 | N.D. |
| | 45 | 0.23±0.01 | 0.89±0.01 |
| | 46 | 0.06±0.01 | N.D. |
| | 47 | 0.36±0.00 | N.D. |
| | 48 | 0.35±0.02 | N.D. |
| | 49 | 0.51±0.07 | N.D. |
| | 50 | 0.90±0.02 | N.D. |
| | 51 | 0.07±0.00 | N.D. |

N.D: not detected

안나토색소는 색소 성분인 *cis*-norbixin 또는 *cis*-bixin을 기준으로 정량 및 정성 분석법은 분석하여야 하며, 본 연구에서 최적화된 시험법은 두 색소의 동시분석을 위하여 적합한 것으로 사료된다.

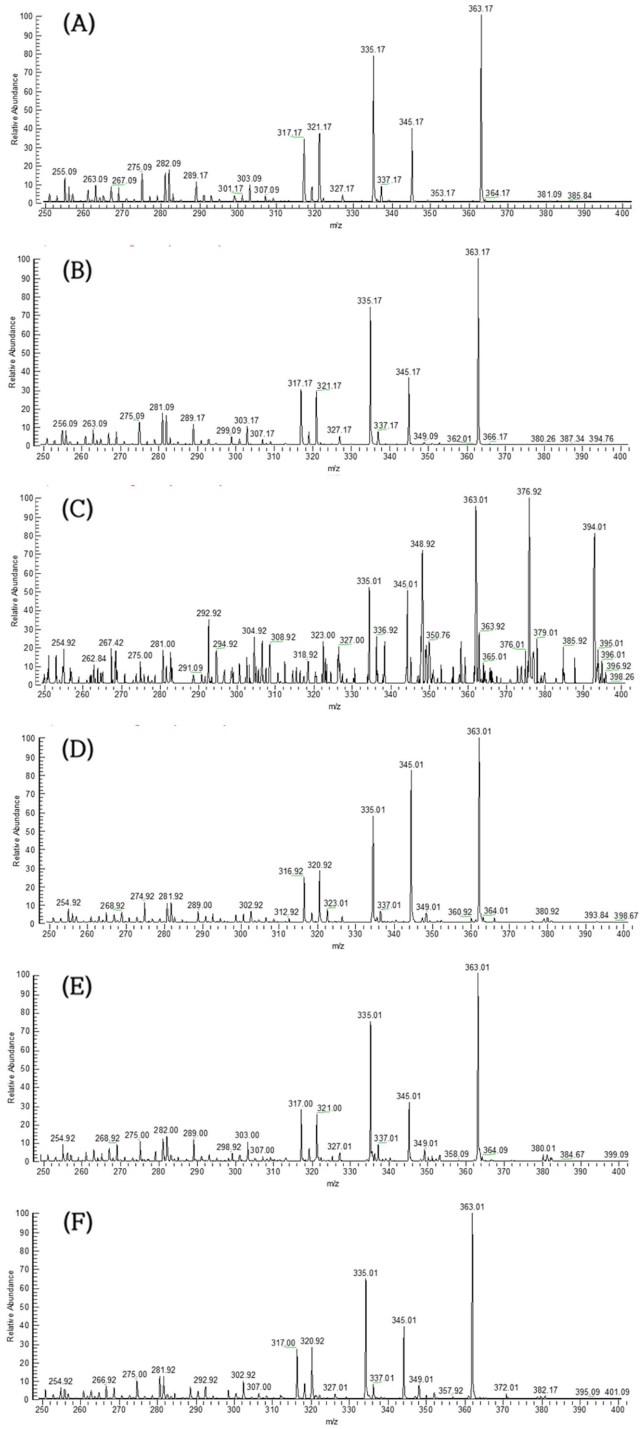


**Fig. 5.** MS/MS spectrum of sample analysis. (A) annatto extract
sample labeled with water-soluble annatto, (D) food sample labe
extract, and (F) food sample labeled with annatto extract.

## Acknowledgement

이 연구는 2020년도 식품의약품안전처의 연구개발비(18162식품위009)로 수행되었으며, 이 논문은 2020년도 중앙대학교 연구년 결과물로 제출됨.

## 국문요약

본 연구의 목적은 식품 중 안나토색소를 검출하기 위하여 주성분인 *cis*-bixin과 *cis*-norbixin의 동시분석법을 개발하는 것이다. 최적 시험법 확립을 위해 국내외 기관 중 유럽식품안전청, 일본 후생노동성, 우리나라 식품의약품안전평가원의 HPLC분석법들을 비교 및 검토하였다. 그리고 직선성, 검출한계, 정량한계 및 분석시간을 고려하여 최적 HPLC 동시분석조건을 선택 후 여러 식품에 적용가능한 최적 전처리법을 개발하였다. 식품의약품안전평가원 HPLC 분석법이 가장 우수한 직선성($R^2$≥0.999)을 보였으며, *cis*-norbixin 및 *cis*-bixin에 대한 검출한계와 정량한계가 각각 0.03과 0.05 μg/mL 그리고 0.097과 0.16 μg/mL로 낮게 나타났다. 모든 보고된 전처리방법은 여러 식품적용에 한계가 있었으며, 어육 및 육가공품, 가공치즈, 음료의 주요 세 식품군 모두에 대해서 높은 회수율을 보이는 최적 전처리법이 새롭게 확립되었다. 이 전처리 방법은 *cis*-norbixin과 *cis*-bixin에 대해서 98% 이상의 우수한 동시 회수율을 나타냈었다. 새로운 전처리방법이 적용된 분석법은 두 성분에 대해 모두 결정계수($R^2$) 1로서 높은 직선성을 나타냈으며, 정확도(회수율)와 정밀도(%RSD)가 각각 평균 98% 및 0.4-7.9 이었다. 이러한 결과로부터 최적화된 분석시험법은 식품 중 안나토색소의 *cis*-norbixin과 *cis*-bixin 두 성분 동시분석에 매우 적합한 것으로 판단되었다.

## Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

## ORCID

Jiyeon Lee https://orcid.org/0000000273403025
Juhee Park https://orcid.org/0000000198640820
Jihyun Lee https://orcid.org/0000000156930109
Hee-Jae Suh https://orcid.org/0000000306313270
Chan Lee https://orcid.org/0000000321557732

## References

1. Scotter, M.J., Thorpe, S.A., Reynolds, S.L., Wilson, L.A., Strutt, P.R., Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Food Addit. Contam.*, **11**, 301-315 (1994).
2. EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), Safety of annatto E and the exposure to the annatto colouring principles bixin and norbixin (E 160b) when used as a food additive, *EFSA J.*, **17**, 5626, (2019).
3. Sabuz, A.A., Khan, M.H.H., Rahman, M.T., Rana, R., Brahma, S., Stability of organic food colorant extracted from annatto seeds on food matrix, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **5**, 10-16 (2020).
4. EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), Safety of annatto extracts (E 160b) as a food additive, *EFSA J.*, **14**, 4544, (2016).
5. Scotter, M.J., Castle, L., Honeybone, C.A., Nelson, C., Method development and analysis of retail foods for annatto food colouring material. *Food Addit. Contam.*, **19**, 205-222 (2002).
6. Attokaran, M., 2011. Natural Food Flavors and Colorants, second ed. Jhon Wiley & Sons Ltd; Wiley-Blackwell, Chicago, IL, USA, pp. 63-67.
7. FAO, (2021. August 23). Annatto Extracts (Chemical and Technical Assessment). Retrieved from http://www.fao.org/3/at973e/at973e.pdf
8. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (67th: 2006: Rome, Italy), World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2007). Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization. Retrieved from https://apps.who.int/iris/handle/10665/43592
9. CODEX Alimentarius, (2021, May 18). GSFA Online. Retrieved from http://www.fao.org/gsfaonline/additives/index.html
10. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (19th: 1983: Rome, Italy), World Health Organization, Evaluation of certain food additives and contaminants: Twenty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization. Retrieved from https://apps.who.int/iris/handle/10665/41546
11. European Union (EU), Commission Regulation (EU) 2020/771 of 11 June 2020 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council and the Annex to Commission Regulation (EU) No 231/2012 as regards the use of Annatto, Bixin, Norbixin (E 160b) (Text with EEA relevance). *OJEU*, **184**, 25-42 (2020).
12. Food additives code. (2021, August 23). Annatto, Water-Soluble. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04_03.jsp?idx=222
13. Food additives code. (2021, August 23). Annatto Extract. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/04_03.jsp?idx=291
14. Ministry of Health, Labour, Welfare. (2021, August 23). Japan's Specifications and Standards for Food Additives, D. Monographs, Annatto Extract, Bixin, Norbixin, Annatto, Water-soluble. Retrieved from http://www.nihs.go.jp/dfa/_src/541/D-210224.pdf
15. Ministry of Health, Labour, Welfare. (2021, August 23). Food additives analysis methods. Retrieved from https://www.ffcr.or.jp/webupload/168bb6f7b3f31735b345b5e65defb1c98a675b07.pdf

16. Food additives analytical methods in foods. (2021, August 23). Food additive analysis method in food. Retrieved from https://www.haccp.or.kr/site/haccp/boardView.do?post=59051&page=16&boardSeq=773&key=2216&category=&searchType=&searchKeyword=&subContents=
17. Noppe, H., Abuin Martinez, S., Verheyden, K., Van Loco, J., Companyó Beltran, R., De Brabander, H.F, Determination of bixin and norbixin in meat using liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Addit. Contam.*, **26**, 17-24 (2009).
18. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2021, August 23). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Retrieved from https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf
19. De Oliveira Rios, A., Mercadante, A.Z., Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. *Food Addit. Contam.*, **21**, 125-133 (2004).
20. Food and Drug Administration, 2019. Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products. Food and Drug Administration, Silver Spring. MD, USA, pp. 1-39.
21. Bareth, A., Strohmar, W., Kitzelmann, E., HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese. *Eur. Food Res. Technol.*, **215**, 359-364 (2002).
22. van Scheppingen, W.B., Boogers, I.A.L.A., Duchateau, A.L.L., Study on decomposition products of norbixin during bleaching with hydrogen peroxide and a peroxidase by means of UPLC-UV and mass spectrometry. *Food Chem.*, **132**, 1354-1359 (2012).
23. Breithaupt, D.E., Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction, *Food Addit. Contam.*, **86**, 449-456 (2004).
24. Lancaster, F.E., Lawrence, J.F., Determination of annatto in high?fat dairy products, margarine and hard candy by solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography, *Food Addit. Contam.*, **12**, 9-19 (1995).