

HPLC-ELSD를 이용한 조제분유 중 fructooligosaccharides 및 raffinose 분석

신만섭 · 박재우 · 조미란 · 송성옥 · 김춘선 · 최춘배 ·
이승원 · 이기웅¹ · 장치훈¹ · 광병만^{1,*}

국립수의과학검역원, ¹남양유업(주) 중앙연구소

Determination of Fructooligosaccharides and Raffinose in Infant Formula by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector

Man-Sub Shin, Jae-Woo Park, Mi-Ran Cho, Sung-Ok Song, Chun-Sun Kim, Chun-Bae Choi,
Seoung-Won Lee, Ki-Woong Lee¹, Chi-Hoon Chang¹, and Byung-Man Kwak^{1,*}

National Veterinary Research and Quarantine Service

¹Research and Development Center, Namyang Dairy Products Corporation

Abstract A method was developed for the determination of fructooligosaccharides and raffinose contents in infant formula. The samples were extracted and analyzed by liquid chromatography equipped with carbohydrate column and evaporative light scattering detector. The mobile phase used for the gradient mode was water-acetonitrile, at a flow rate of 1.0 mL/min. The method showed a mean recovery of 95-99%, the relative standard deviation obtained in the precision study was 0.774-8.982%, the quantification and detection limits were 25-50 mg/L.

Key words: fructooligosaccharide, raffinose, infant formula, HPLC, evaporative light scattering detector

서 론

조제분유는 한국인의 영양권장량(1) 기준에 맞추어 다양한 영양성분들이 함유되도록 조제된 영아용 식품이다. 이러한 조제분유 중의 각종 영양성분들을 분석하고 그 적합성을 판단할 수 있도록 각종 실험방법들이 식품공전(2) 및 AOAC(3)에 소개되어 있으며, 그 복잡한 매질특성으로 인한 시험과정 중의 여러 가지 문제점을 해결하기 위해 다양한 실험방법들이 연구되고 있다.

탄수화물의 섭취는 총열량의 50-70%를 복합당질에서 섭취할 것을 세계보건기구(WHO)는 제안하고 있다(4). 이러한 제안은 복합당질이 체중의 과다한 증가를 방지하고 고지혈증과 당뇨병을 관리하는데 효과적이고 암의 발병을 낮추는데 유용하며, 또한 복합당질의 급원인 식물성 식품을 섭취하면 필수지방산, 칼슘, 아연, 철분과 다양한 수용성 비타민을 동시에 섭취할 수 있는 이점에 근거를 두고 있다.

올리고당은 포도당, 과당, 갈락토스와 같은 단당류가 2 내지 8 개 결합한 일종의 탄수화물로 식물체에 자연적으로 존재하며 화학구조는 Fig. 1과 같다. 대표적인 올리고당으로서는 프락토올리고당, 대두올리고당, 갈락토올리고당으로 주된 생리적 기능은 유

산균 증식 효과로서 장내 소화효소에 의해서 분해되지 않고 대장까지 도달하여 그 곳에 서식하고 있는 비피더스균을 비롯한 장내 유용한 세균에 이용되며 유해세균 또는 병원성 세균의 증식을 억제하며 혈액 중 콜레스테롤 수치를 감소시켜준다. 이러한 장점 때문에 올리고당의 기능성에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이를 첨가한 조제분유의 생산이 증가하고 있다. 하루 3g의 섭취로 효과를 기대할 수 있다고 하나, 이러한 장점에도 불구하고 한 번에 과량을 섭취하면 설사를 유발하는 것과 같은 효과를 가져와 묽은 변 등의 불편감을 초래할 수도 있다(5-7).

올리고당을 분석할 수 있는 방법으로 descending paper chromatography(8), thin layer chromatography(TLC)(9,10), adsorption chromatography(11), gel filtration chromatography(12-14), gas liquid chromatography(15) 및 high performance liquid chromatography(HPLC)(16)를 이용하여 분리, 정성 또는 정량되어져 왔으며, 이 중 HPLC가 당의 분리 및 정량에 빠르고 편리하며 정확한 방법으로 알려져 있다. HPLC에 의한 fructose oligomer의 분리는 cation exchange column(17), Spheriosrb-5-NH₂ column, anion exchange column, 비색법과 HPLC(18)를 이용하여 행하여져 왔으나 이들을 정량한 것에 대해서는 발표된 논문이 별로 없는 실정이다. 분유에서 당류 분석법은 HPLC refractive index(RI) detector를 사용하여 분석하는 방법(19)이 발표되어 있으며 다른 식품에서 프락토올리고당을 분석하는 방법으로 이온크로마토그래피(20)를 이용하는 분석법이 발표되어 있다. 현재 식품공전에는 올리고당류를 프락토올리고당, 이소말토올리고당, 갈락토올리고당, 말토올리고당, 자일로올리고당, 혼합올리고당 등 크게 여섯 가지 식품유형으로 분류하고 있고 각각 올리고당류의 분석법이 HPLC

*Corresponding author: Byung-Man Kwak, Research and Development Center, Namyang Dairy Products Co., Ltd., 160, Bongnan-ri, Janggi-myun, Gongju-Si, Chungcheongnam-do, 314-914, Korea
Tel: 82-41-856-0381
Fax: 82-03-3262-0660
E-mail: fivefive@namyangi.com
Received May 4, 2006; accepted October 14, 2006

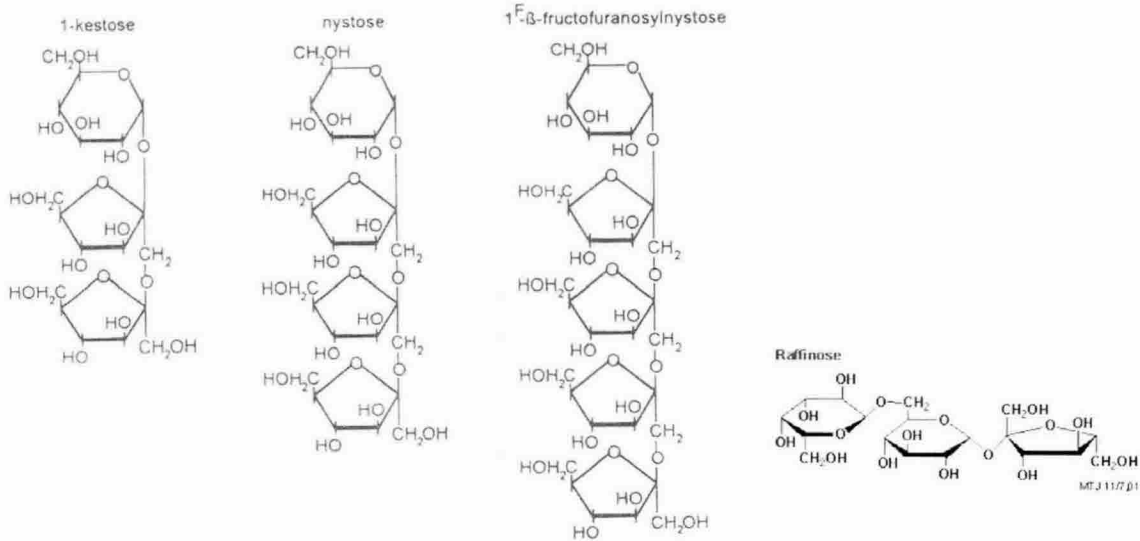


Fig. 1. Molecular structures of the fructooligosaccharides (FOS) and raffinose that were quantified.

RI detector를 사용하는 방법으로 기재되어 있다. 기존의 당분석법인 RI detector를 이용한 분석법은 온도의 안정화, 기울기 용매 사용에 한계가 있다.

본 연구에서는 분유에 기능성 성분으로 첨가한 올리고당류중 1-kestose, raffinose, nystose 및 1^F-β-fructofuranosylnystose를 분석하기 위하여 증기화광산란검출기(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)를 사용 하였다. ELSD는 컬럼을 통과한 용매를 질소가스로 분무시켜 미세한 입자를 형성하여 분사시킨다. 분산된 미세입자 중 이동상은 기화되고, 건조된 미세한 시료 입자가 레이저빔과 충돌하면서 발생하는 산란광을 검출한다. 증기화광산란검출기는 이동상보다 휘발성이 낮은 시료도 분석이 가능한 장점이 있다. 또한, RI detector보다 검출한계가 낮고, 시료의 광학적 특성이나 시료가 가지고 있는 관능기와 상관없이 검출이 가능하며, 이동상의 조성에 변화를 줄 수 있기 때문에 기울기 용매 방법을 사용하여 유속과 검출기의 온도 및 압력을 변화시켜 최적 분석 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험 재료로 사용한 시료는 프락토올리고당이 700 mg/100 g, 라피노스가 300 mg/100 g이 표시된 N사의 분유와 blank 실험용으로 N사의 유기농 분유 1단계를 사용하였다. 정성 및 정량 분석을 위하여 사용된 표준품으로 1-kestose, raffinose, nystose 및 1^F-β-fructofuranosylnystose를 Supelco사(Bellefonte, PA USA)에서 구입하여 사용하였다.

그 밖의 시약으로 HPLC용 H₂O, acetonitrile, absolute ethanol, chloroform은 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 HPLC grade를 구입하여 사용하였으며 oxalic acid는 특급시약을 사용하였다. 초순수는 Barnstead EASY pure system(Dubuque, Iowa, USA)에 의하여 18.0 MΩ 수준으로 정제된 물을 사용하였다.

표준품 조제

각각의 표준품 200 mg을 정확히 달아 증류수에 녹이고 20 mL (10,000 mg/L)로 한다. 이를 각각 2 mL를 취하여 증류수로 20 mL (1,000 mg/L)로 혼합표준용액을 조제한다. 이 혼합표준용액을 50,

100, 200, 400, 800 μL를 취하고, 증류수로 1 mL이 되게 희석하여 표준 곡성을 작성하였으며, 시험 당일 즉시 만들어 사용하였다. 200, 2,000 μg/mL 농도로 혼합표준용액을 당일 제조하여 ELSD와 RID 검출기의 감도 비교 실험에 사용하였다.

첨가회수 실험

첨가회수 실험은 blank 실험용 시료에 각각의 당을 400 mg/L 농도로 조제한 표준용액 1 mL을 첨가한 후 첨가하지 않은 시료와 동일하게 처리하여 정량하였다. 그 결과 값을 이용하여 첨가량을 기준으로 회수율을 계산하였다.

시험용액 조제

시료 무게는 1.5 g씩 0.1 mg까지 정밀히 취하여 50 mL screw-capped extraction tube에 넣고 시료를 용해하기 위해서 증류수 2 mL, 95% ethanol 5 mL를 넣고, 단백질을 침전시켜 제거하기 위해 5% oxalic acid 0.5 mL을 넣는다. 1분정도 vortex하여 잘 녹인 후 5분간 shaking하였다. 증류수로 20 mL로 맞추고, 지방성분들이 잘 분산되게 하기 위해서 chloroform 10 mL을 가한 후 1분간 vortex한다. 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 0.2 μm NY filter를 통과시켜 시험용액을 조제한 후 기기 분석에 이용하였다. 단, 실험실내의 환경조건은 온도 23 ± 2°C, 습도 50 ± 5%에서 수행하였다.

기기분석

본 연구의 실험방법에 의한 올리고당 분석은 HPLC(Agilent 1100, Palo Alto, CA, USA)을 사용하였다. 컬럼은 Prevail™ Carbohydrate ES, 5 μm, 4.6 × 250 mm을 사용하였으며, 컬럼 온도는 30°C, 이동상은 1.0 mL/min의 유속으로 acetonitrile(solvent A)과 H₂O(solvent B)의 2가지 용매를 사용하여 0-28 min까지 solvent B 25%, 38 min까지 solvent B 40%, 45 min까지 solvent B 45%, 45.01-50 min까지 solvent B 50%, post time 10분 동안 solvent B 20%의 gradient program을 작성하여 분석하였다. 검출기는 ELSD(Alltech, Deerfield, IL, USA)를 사용하여 tube temperature 90°C, N₂ gas flow 2.0 L/min, gain 1로 고정하여 분석하였다(Table 1).

Refractive index(RI) detector(Agilent 1100, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 ELSD와의 감도를 비교하였다. 컬럼 및 컬럼은

Table 1. HPLC/ELSD conditions for analysis of fructooligosaccharides and raffinose

HPLC(HP 1100) with ELSD	
Column	Prevail™ Carbohydrate ES, 5 µm, 4.6 × 250 mm
Mobile phase	A: acetonitrile, B: water (gradient mode)
Gradient	Time: 0 28 38 45 50 %B: 25 25 40 45 50
Flow rate	1.0 mL/min
Column Temp.	30°C
Detector	ELSD (tube temp. 90°C, N ₂ gas flow 2.0 L/min, gain 1)

도는 ELSD 분석 조건과 동일하게 하였으며 이동상은 RID의 gradient program을 사용할 수 없는 한계가 있어 acetonitrile:H₂O (75:25, v/v) isocratic 조건으로 분석하여 비교하였다.

LOD, LOQ 측정

Signal to noise ratio(S/N ratio)가 3/1이 되는 농도를 LOD로, 10/1이 되는 농도를 LOQ로 정하였다. S/N ratio는 Chemstation software(Agilent 1100, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

실험실간 비교실험

함량표시가 raffinose 300 mg/100 g, fructooligosaccharides 700 mg/100 g인 표준시료를 사용하여 5개 실험실에서 본 연구에서 설정한 전처리와 기기분석조건으로 5회 분석하여 평균, 표준편차, 상대표준편차를 측정하여 비교하였다.

시중 유통 중인 조제분유에서의 올리고당 분석

시중에서 유통 중인 조제분유 중 raffinose와 fructooligosaccharides를 함유한 제품 6종을 구입하여 본 연구에서 설정한 전처리 및 기기분석조건으로 분석하였다.

결과 및 고찰

HPLC-ELSD를 이용한 회수실험 및 재현성 확인 결과

4종의 당 회수실험결과는 실험실의 시료 전처리에 사용하는 장비, 분석기기, 환경조건 등의 차이에 따라 다소 차이가 있을 수

Table 2. Recoveries of FOS and raffinose in spiked samples (n = 5)

Compound name (amount = 200 µg/mL)	Retention time (min)	RSD ¹⁾	Area mean	RSD ²⁾	Recovery (%)
1-kestose	24.335	0.395	295.6	1.475	98.17 ± 2.6 ³⁾
raffinose	26.136	0.414	216.0	8.982	99.63 ± 2.2
nystose	36.244	0.132	456.6	0.774	95.77 ± 2.2
1 ^F -β-fructofuranosylnystose	40.599	0.061	281.3	2.021	95.01 ± 2.8

¹⁾Relative standard deviation of retention time (min).

²⁾Relative standard deviation of area.

³⁾Shown values are mean ± standard deviation.

Table 3. Calibration curve equation of fructooligosaccharides and raffinose (n = 5)

Compound name	Calibration curve equation ¹⁾	Correlation coefficient (R ²)
1-kestose	Y = 0.0056X ² + 0.7960X - 7.115	1.0000
raffinose	Y = 0.0047X ² + 0.6100X + 3.966	0.9999
nystose	Y = 0.0067X ² + 1.1785X - 2.247	1.0000
1 ^F -β-fructofuranosylnystose	Y = 0.0043X ² + 0.8631X - 13.26	1.0000

¹⁾Curve type: Quadratic, Y: area, X: amount (µg/mL).

Table 4. LOD and LOQ of fructooligosaccharides and raffinose

Compound name	LOD (µg/mL)	S/N	LOQ (µg/mL)	S/N ¹⁾
1-kestose	50	4.3	100	14.4
raffinose	50	3.5	100	10.9
nystose	25	2.7	50	8.5
1 ^F -β-fructofuranosylnystose	25	2.8	50	9.1

¹⁾Signal to noise ratio.

있겠지만, 본 연구에 사용한 전처리법을 이용하여 분석 대상물질이 들어있지 않은 공시료에 표준품 농도가 각각 200 µg/mL가 되게 첨가하여 회수율 실험을 하였다. 모두 5회 반복하였으며, 결과는 Table 2에서와 같이 머무름 시간의 RSD값은 0.061-0.414%, 면적값의 RSD값은 0.774-8.982%, 회수율은 95-99%로 분석되었다.

HPLC-ELSD에 의한 표준당들의 표준곡선 작성

검량선을 작성하기 위해 혼합표준용액을 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL 농도로 제조하여 사용하였다. Table 1의 분석조건으로 얻은 피크면적과 농도비로 검량선을 작성하였으며, 검량선 작성 식은 quadratic curve를 사용하였다. 이들 검량선의 상관계수는 0.999 이상으로 양호하였다. 검량선 작성 식은 Table 3과 같다.

분석조건에 따른 limit of detection(LOD), limit of quantification(LOQ) 확인

위에서 설정된 기기분석조건의 검출한계 및 정량한계를 구하였다. 1-kestose, raffinose의 LOD는 50 µg/mL, nystose, 1^F-β-fructofuranosylnystose는 25 µg/mL로 나타났으며, 1-kestose, raffinose의 LOQ는 100 µg/mL, nystose, 1^F-β-fructofuranosylnystose는 50 µg/mL로 분석되었다(Table 4).

HPLC-ELSD와 RID 검출기의 감도비교

본 연구에서 사용한 증기화광산란검출기(ELSD)의 감도와 일반적인 당분석에 주로 사용되고 있는 시차굴절계 검출기(refractive index detector)를 비교해 보았다. Fig. 2의 A는 혼합표준용액 200 µg/mL를 ELSD로 분석한 크로마토그램이며, B는 공시료를 ELSD

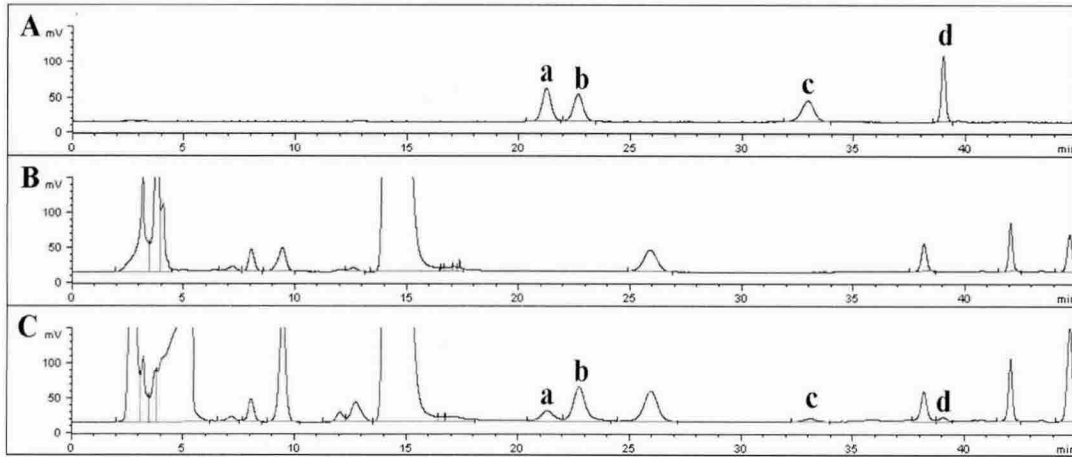


Fig. 2. HPLC-ELSD chromatogram of fructooligosaccharides, raffinose standards, blank infant formula, and infant formula sample (Prevail™ Carbohydrate ES column, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm, Gradient mobile phase 75% to 50% Acetonitrile in H₂O, flow rate 1.0 mL/min). A: fructooligosaccharides and raffinose standards (200 μ g/mL), B: blank infant formula, C: infant formula, a: 1-kestose, b: raffinose, c.: nystose, d: 1^F- β -fructofuranosylnystose.

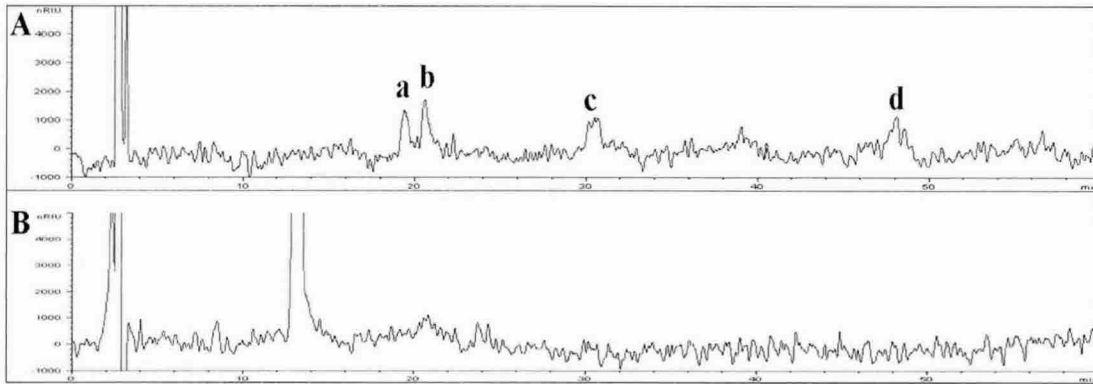


Fig. 3. HPLC-RID chromatogram of fructooligosaccharides, raffinose standards and infant formula sample (Prevail™ Carbohydrate ES column, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm, Isocratic mobile phase 75% Acetonitrile in H₂O, flow rate 1.0 mL/min). A: fructooligosaccharides and raffinose standards (2,000 μ g/mL), B: infant formula, a: 1-kestose, b: raffinose, c: nystose, d: 1^F- β -fructofuranosylnystose.

로 분석한 크로마토그램, C는 시료를 분석한 크로마토그램이다. Fig. 3의 A는 혼합표준용액 2,000 μ g/mL를 RID로 분석한 크로마토그램이며, B는 Fig. 2의 C와 동일한 시료를 전처리하여 RID에서 분석한 크로마토그램이다. 이상의 결과에서 나타나는 바와 같이 ELSD가 RID보다 본 연구의 분석대상물질을 분석하는데 있어서 매우 우수한 감도를 보이며, 정성하거나 정량하는데 있어 효율적인 검출기임을 알 수 있었다.

실험실간 비교 실험

확립된 전처리법과 기기분석조건의 유효성을 검증하기 위하여 5개의 실험실에서 비교실험을 수행하였다. 5개 실험실에서 동일 시료, 동일 실험방법으로 수행한 결과 Table 5와 같은 실험결과를 얻었다. 각각의 실험실에서의 결과를 보면 사용된 시료의 fructooligosaccharides와 raffinose의 함량이 표시함량보다 다소 높게 측정 되었으나 측정시료에서 보장된 균일성과 실험오차를 고려하면 유사한 결과가 산출되었음을 알 수 있다($p < 0.05$). 따라서 본 연구의 전처리 실험 방법과 HPLC-ELSD를 이용한다면 보다 정확한 분석결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

시중 유통 중인 조제분유에서의 올리고당 함량조사

시중에 유통되고 있는 조제분유에 본 연구에서 확립한 전처리법과 기기분석조건을 적용하여 분석해보았다. 결과는 Table 6과 같으며, 표시된 함량을 검사하는데 충분히 유의성이 있는 것으로 나타났다.

요 약

본 연구에서는 1-kestose, raffinose, nystose 및 1^F- β -fructofuranosylnystose 등 4종 올리고당 분석을 위하여 기용기용매가 가능한 증기화광산검출기를 사용하여 이동상 조성, 유속 등 최적 조건을 설정하였다. 설정한 분석조건을 이용하여 표준액을 농도 별로 희석(50, 100, 200, 400, 800 μ g/mL)하여 검량선을 quadratic curve로 작성한 결과 상관계수는 1-kestose(1.0000), raffinose(0.9999), nystose(1.0000), 1^F- β -fructofuranosylnystose(1.0000)로 나타났다. 또한 분석조건의 재현성을 측정하기 위하여 혼합표준액 200 μ g/mL을 5회 주입한 면적 값의 RSD는 1-kestose(1.47), raffinose(8.98), nystose(0.77), 1^F- β -fructofuranosylnystose(2.02)으로

Table 5. Interlaboratory test results of fructooligosaccharides and raffinose in infant formula (n = 5)

	raffinose (mg/100 g)	fructooligosaccharides (mg/100 g)		
		1-kestose	nystose	1 ^F -β-fructofuranosylnystose
Lab. A	471 ± 36 ¹⁾ 7.56 ²⁾	536 ± 48 8.93	333 ± 24 7.27	185 ± 17 9.40
Lab. B	403 ± 10 2.44	494 ± 10 2.06	342 ± 12 3.38	160 ± 6 3.78
Lab. C	507 ± 48 9.44	531 ± 54 10.19	401 ± 48 11.9	156 ± 21 13.37
Lab. D	422 ± 14 3.27	510 ± 17 3.33	345 ± 15 4.41	171 ± 10 5.61
Lab. E	439 ± 13 3.05	561 ± 9 1.65	404 ± 20 5.06	168 ± 6 3.82
	448 ± 41 9.19	526 ± 26 4.87	365 ± 35 9.46	168 ± 11 6.69

¹⁾Shown values are mean ± standard deviation.

²⁾Relative standard deviation.

Table 6. Survey of fructooligosaccharides and raffinose in market infant formula

Sample number	raffinose		fructooligosaccharides	
	Label (mg/100 g)	Results (mg/100 g)	Label (mg/100 g)	Results (mg/100 g)
1	500	647	400	627
2	400	572	700	1073
3	300	481	-	-
4	450	787	1000	873
5	300	521	700	1385
6	500	685	200	461

나타났다. 또한 사용된 시료의 프락토올리고당의 측정된 함량 결정계수에 대한 t-검정결과 모든 표준당에 대해 상관성이 유의($p < 0.05$)함을 알 수 있어 본 HPLC-ELSD방법에 의한 정량이 타당한 것으로 나타났다. 본 방법을 통하여 fructooligosaccharides 및 raffinose 분석에 유용할 것으로 사료된다.

감사의 글

실험실간 비교실험에 참여해 주신 국립수의과학검역원 동물약품과, 전북축산진흥연구소, 중부대학교 산학협력단 분석센터, 남양유업(주) 중앙연구소에 감사드립니다.

문헌

1. The Korean Nutrition Society. Recommended Dietary Allowances for Koreans. 7th rev. The Korea Nutrition Society, Seoul, Korea. p. 490 (2001)
2. Korea Food and Drug Administration. Food Standards Codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea. pp. 170-180 (2005)
3. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 17th ed. Methods 50.1.01~25. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, USA. (2000)
4. WHO. Technical Report Series, No. 797, Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases. (1990)

5. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota. *J. Nutr.* 125: 1401-1412 (1995)
6. Chen HL, Lu YH, Lin J Jr, Ko LY. Effects of fructooligosaccharides on bowel function and indicators of nutritional status in constipated elderly men. *Nutr. Res.* 20: 1725-1733 (2000)
7. Tomomatsu H. Health effects of oligosaccharides. *Food Technol.* 48: 61-65 (1994)
8. Umeki K, Kainuma K. Fractionation of maltosaccharides of relatively high degree of polymerization by multiple descending paper chromatography. *J. Chromatogr. A.* 150: 242-245 (1978)
9. Collins FW, Chandorkar KR. Thin-layer chromatography of fructo-oligosaccharides. *J. Chromatogr. A.* 56: 163-167 (1971)
10. Lee JH, Lee HW, Lee HK, Cho DL, Sunwo CS, Park KD, Choi JS, Kim DW, Kim DM. Simple and quantitative analysis method for total carbohydrate concentration in oligosaccharides by using TLC. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 269-273 (2004)
11. Yoo JW, Choo GY, Rho SG, Kim TY, Cho SY, Kim SJ. Adsorption and separation characteristics of maltooligosaccharides. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 14: 787-792 (2003)
12. Pontis HG. Separation of fructosans by gel filtration. *Anal. Biochem.* 23: 331-333 (1968)
13. Points HG. Observations on the de novo synthesis of fructosans in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 116: 416-424 (1966)
14. Christopher JP. Oligosaccharide intermediates of fructan synthesis in *Lolium temulentum*. *Phytochem.* 21: 2461-2465 (1982)
15. Christopher JP, Micheal AH, David PR. Structural analysis of fructose polymers by gas-liquid chromatography and gel filtration. *J. Chromatogr. A.* 171: 411-415 (1979)
16. Bancal P, Gaudillere JP. Oligofructan separation and quantification by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 745-749 (1989)
17. Scobell HD, Brabst KM. Rapid high-resolution separation of oligosaccharides on silver form cation-exchange resins. *J. Chromatogr. A.* 72: 51-64 (1981)
18. Kang KJ, Cho JI. Comparison of colorimetry and HPLC method for quantitative analysis of chitooligosaccharide. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 788-791 (2000)
19. Ferreira IMPLVO, Gomes AMP, Ferreira MA. Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydr. Polym.* 37: 225-229 (1998)
20. Campbell JM, Bauer LL, Fahey GC, Jr., Hogarth AJCL, Wolf BW, Hunter DE. Selected fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose, and 1^F-β-Fructofuranosylnystose) composition of foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3076-3082 (1997)