Aflatoxin에 대한 최신 분석법과 규제동향

정 덕 화
경상대학교 식품공학과

Development of Rapid, Safe Analytical Techniques of Aflatoxins and Their Current Regulation

Duck-Hwa Chung
Gyeongsang National University (Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea)

ABSTRACT-Aflatoxins is a chemically diverse group of toxic secondary metabolites that are produced by fungi and often occur in agricultural commodities. Because of their wide range of toxic effects, aflatoxin cause severe economic losses to farmers and livestock producers and pose a health to human consuming contaminated foods. Long term prospects for biotechnological control of aflatoxin require elucidation of the specific steps and regulation of their biosynthetic pathways. Aflatoxin determinations can be approached many ways. It is essential to safely handle all experimental materials associated with aflatoxin analysis or aflatoxigenic fungi. Visual screening of suspect samples, based on the presence of conidial head of the *Aspergillus flavus* group, and screening samples for the presence of bright greenish yellow flourescence are not chemical tests and such screening techniques may allow aflatoxin contaminated lots into commerce. Microcolumn screening procedures should always be used in conjunction with a quantitative method. Several thin layer chromatography(TLC) ans high performance liquid chromatography(HPLC) methods are suitable for quantitation and are in general use.

Immunochemical methods such as the ELISA or affinity column chromatography methods are being rapidly developed. The chemical and immunochemical methods can be reliable if care is taken, using suitable controls and personnel that are well trained. All analytical laboratories should stress safety and include suitable analytical validation procedure.

Especially a worldwide enquiry was undertaken in recent to obtain up-to-date information about aflatoxin legislation in as many countries of the world as possible.

The information concerns aflatoxin in foodstuffs, aflatoxin MI in dairy products, aflatoxins in animal feedstuffs. Limits and regulations for aflatoxin have been expended in recent with more countries having legislation on subject, more products, and more aflatoxins covered by this legislation.

I. 서 론

국민 경제수준의 향상과 더불어 우리의 식생활에도 많은 변화가 초래되었고 이에 따라 안전성이 확보된 무공해 농산물의 생산이 절실히 요구되고 있는 바 유해 미생물의 오염, aflatoxin을 비롯한 각종 mycotoxin 및 중금속의 농산물에서의 오염 여부에 대한 관심도가 높아져 이 분야의 체계적 연구가 절실히 요청되고 있다.

특히 수종의 *Aspergillus*속의 대사산물이 실제로 동물에 대해 암을 유발시킨다는 보고가 발표된 이래 여러 학자들에 의해 이들 유해 곰팡이의 농산물에의 오염과 이로 인한 문제점이 계속적으로 지적되어 왔다.

종래 mycotoxin 분석에 의존해 왔던 TLC, HPLC법은 추출과 정제에 많은 시간과 유기 용매가

소비되고 넓은 공간, 많은 기구 그리고 전문 인력을 필요로 하여 경제성이 낮을 뿐만 아니라 처리 과정에서 수반되는 안전성 문제가 심각하게 제기되어 이를 극복하기 위한 노력으로 면역 분석법이 식품 중 mycotoxin 분석에 응용되었다. 특히 외국에서의 mycotoxin에 대한 오랫동안의 활발한 연구와는 달리 국내에서의 연구 결과는 대단히 미흡하며, 최근 오염된 옥수수의 국내 수입이 문제되면서 관련 업계나 연구소 등에서 관심을 갖기 시작하여 기기분석과 함께 수입된 ELISA kit의 사용으로 aflatoxin의 자체분석을 시도하고 있으나 기술 축적의 미비, 안전성의 문제점, 그리고 비싼 수입 kit에 의한 경제성 문제 등으로 실질적인 분석이 매우 어려운 실정이다. 따라서 식품과 수입 농산물에서의 신속, 정확하며 안전한 분석법의 확립과 이를 뒷받침할 aflatoxin의 분석을 위해 값싼 국내 ELISA kit 개발이 절실히 요구되고 있다.

이러한 실정을 감안하여 식품과 사료에서의 aflatoxin 오염 실태, 지금까지의 aflatoxin 분석 방법 및 최근 개발된 면역분석법의 이해와 향후 개선방향, 그리고 각국의 법적 규제 동향 등을 검토함으로써 농산물 수입 개방의 시대를 맞아 안전성이 보장된 농산물의 확보와 더불어 수입 압력에 능동적으로 대처하는 방안을 모색하고자 한다.

II. 농산물에서의 aflatoxin 오염 현황

최근 미국은 이상 기온과 가뭄으로 인하여 옥수수를 비롯한 많은 농산물이 aflatoxin에 오염되었을 가능성에 대해 우려해 왔으며, 실제로 지난해 4월 5일에는 우리나라가 수입한 600만톤 중 400만톤의 옥수수가 aflatoxin에 오염되었음을 워싱턴 포스트지가 폭로한 바 있고 국내에서도 수입된 옥수수 중 aflatoxin이 오염된 것을 확인한 바 있다.

그리고 Garnett은 미국산 땅콩, 옥수수 및 그 제품을 비롯한 많은 시료에 대한 실험 결과 Table 1과 같이 aflatoxin이 높게 오염되어 있었으며, 특히 사료용 옥수수의 경우 Texas산 시료에서는 74%가 aflatoxin을 함유하고 있었고 cotton seed도 Arizona California산 시료에서 오염률이 80%를 나타내었다.

한편 지난해 정 등은 한국산 곡류를 중심으로 aflatoxin 오염 여부를 조사하여 본 결과 aflatoxin 생성 곰팡이의 분리는 물론 3.4%의 aflatoxin 오염 시료를 확인하여 보고한 바 있다.

실제로 외국에서의 많은 data와는 달리 국내에서는 오염 현황에 대한 자료가 대단히 미흡하며, 특히 수입 곡류를 비롯한 농산물에 대한 조사 결과가 발표되지 않고 있는 실정이다. 따라서 과연 우리는 안전한 농산물을 공급받고 있는지, 그 확인은 어떻게 하며, 수입, 운송, 저장 중의 오염 여부 등에 대한 의문이 많은 사람을 통해 제기되고 있다.

III. 농산물에서의 aflatoxin 분석

1. 안전성

1) 화학적 안전성 : Aflatoxin을 취급하는 경우

Table 1. Aflatoxins in manufactured corn-based products designated for anlmal consumption

Human food area of U.S.	Total[a] products/samples	Determinable aflatoxins				
		Number of products/samples[b]	Percent of products/samples	Average μg/kg	Maximum μg/kg	Number >20 μg/kg
Southeast	70	33	47	369	3872	19
Corn belt	74	2	3	69	133	1
Virginia-Maryland	4	0	0	ND	ND	0
Arkansas-Texas	39	29	74	406	2839	23
California	3	1	33	–	2	0
Rest of U.S.	13	0	0	ND	ND	0

[a]Total number of products/samples examined.
[b]Total number of products/samples with detectable levels of aflatoxins.
(Tetsuhisa: 1990)

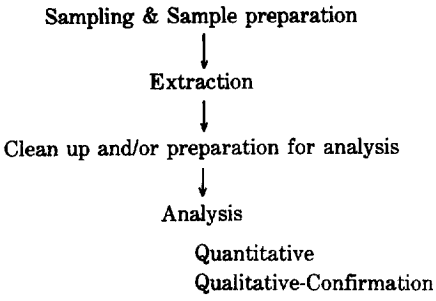

Fig. 1. Steps of mycotoxin analysis.

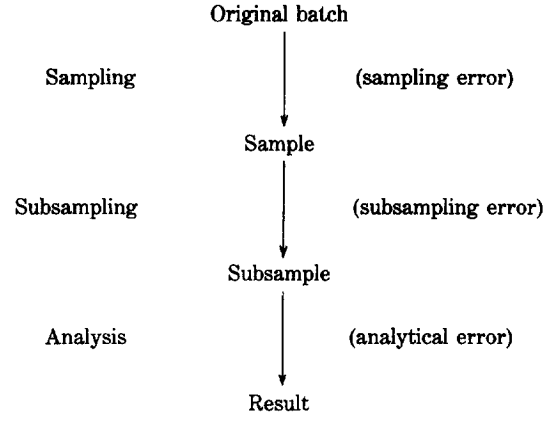

Fig. 2. Errors associated with mycotoxin analysis.

안전성에 대해서는 거듭 강조되어 그 전체적 지침이 The Association of Official Analytical Chemists (AOAC : 1990)의 chapter 49에 잘 나타나 있다.

즉 aflatoxin을 비롯한 mycotoxin은 반드시 고무장갑을 끼고 다루어야 하며, safety cabinet이나 hood내에서 작업을 해야 한다. 특히 분말 상태의 aflatoxin은 공기 중 확산을 주의해야 하며 표준액으로 사용할 aflatoxin의 경우 합성하는 것 보다 시약상으로부터 구입해서 쓰는 것이 바람직하고 구입한 순품이라 할지라도 반드시 사용된 농도를 확인하여 쓰도록 해야 한다. 실험한 도구나 실험대는 반드시 1% NaOCl 용액으로 10분간 처리하고 5% acetone 용액으로 닦아야 하며, 사용한 초자기구는 먼저 methanol에 씻고 1% NaOCl에 담근 다음 5% acetone 용액에 30분간 담근 후 세척해야 한다.

2) 생물학적 안전성

*Asp. flavus*나 *Asp. parasiticus* 등의 포자는 알레르기 전염병, 중독 등의 증상을 초래하며, 그 중 *Asp. flavus*에 의한 전염은 흔하지는 않으나 가능하며 공기나 먼지 중의 포자는 알레기를, aflatoxin을 함유한 포자는 중독을 유발하므로 실험 후 aflatoxin 생성균의 포자는 반드시 멸균 후 제거하고 균접종, 생성물의 측정, 균체 마쇄시에 생기는 오염방지와 이를 위한 마스크, 장갑, 실험복 착용이 반드시 행해져야 할 것이다.

2. Sampling

Aflatoxin을 분석하기 위해서는 Fig. 1과 같은 여러 과정이 필요하며 그 중에서도 sampling과 시료 조제과정은 매우 중요하여 대부분의 오차가 이 과정에서 발생한다.

즉 실제로 전체 오차는 Fig. 2에서와 같이 80% 정도가 1차 sampling에서 일어나며 2차 sampling 및 분석시의 오차는 20% 정도에 지나지 않으므로 sampling에 세심한 주의가 요청되고, 실험 대상 농산물을 대표할 수 있는 신뢰성 있는 sampling이 수반되어야 할 것이다.

3. Aflatoxin 검색

1) 시료의 추출, 정제

시료 중의 aflatoxin 추출은 AOAC法에 준한다. 즉 액체 배지 25 m*l*에 동량의 chloroform을 가하여 2.5시간 진탕시켜 추출하거나 고체 배양물 30g에 증류수 15 m*l*, chloroform 150 m*l* 및 규조토 15g을 가하여 waring blender로 5분간 추출한다. 이 각각의 추출물을 2.5시간 진탕시킨 다음 규조토를 균일하게 깐 Büchner funnel로 여과한 후 분액여두로 분획하여 chloroform층만 분리한 후 50 m*l*로 감압 농축해서 column chromatography를 행한다.

먼저 glass filter가 부착된 22×300 mm column에 무수 Na_2SO_4 5g을 가하고 chloroform을 1/2 정도 채운다. 그 위에 chloroform으로 현탁하여 활성화된 silica gel 10g을 가하여 15분간 방치한 다음 15g의 무수 Na_2SO_4를 다시 첨가한다.

이렇게 충진된 column에 chloroform 추출물 50 m*l*를 흡착시킨 후 유속 10~20 m*l*/min가 되도록 질소 gas로 조절하여 n-hexane 150 m*l*와 ethyl ether 150 m*l*로 지방과 색소를 제거하며, column에 흡착된 aflatoxin은 chloroform : methanol(97 : 3)의 혼합액으로 용출시켜 이 용출액으로 감압 농축하여 소량의 chloroform으로 vial에 씻어 넣어 진

Table 2. Condition of HPLC for the analysis of aflatoxin

Type: G1LSON
Detector: U.V. 360 nm
Column: ODS2 (REVERSE PHASE)
Flow: 2 ml/min
Mobile Phase: METHANOL/WATER
Integration time: 40.00 min
Peak width: 0.20 min
Peak sensitivity: 2.0%
Minimum area: 1000

공건조기에서 상온 건조한다.

2) aflatoxin 정성

정성용 TLC 분석으로는 AOAC法을 참고하여 상기의 정제된 건고물에 1 ml의 benzene : acetonitrile (98 : 2)을 가하고 1분간 진탕한 다음, 활성화된 0.25 mm silica gel H plate 10 μl씩 spotting하고 50℃에서 30분간 plate를 다시 활성화시켜서 24±1℃로 조절된 암실에서 chloroform : acetone(9 : 1) 혼합액을 전개 용매로 하여 약 40분간 표준 aflatoxin과 같이 전개시킨다. 분리가 완료되면 plate를 꺼내서 용매를 완전히 날려 보낸 뒤 자외선 등(UVSL 25 ultra-violet product INS. U.S.A.)의 365 nm에서 표준품과 비교하여 정성한다.

또한 aflatoxin 분석은 여러 가지 방법으로 접근할 수 있다. 예를 들면 땅콩이나 옥수수의 경우 대부분 aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2로서 이들을 정량하기 전에 우선 많은 sample로부터 aflatoxin에 대한 예비검색을 하여 오염 가능 sample을 소수 찾아낸 다음 정량을 하는 것이 보다 효과적일 수 있다. 이를 위해 *Asp. flavus* 포자낭은 푸른 형광 생성 유무를 관찰할 수 있어 정량 분석시의 노력을 절감할 수 있다.

3) HPLC에 의한 aflatoxin 정량

앞서 정제된 시료 혹은 TLC chromatogram을 용출시켜 Sep pak minicolumn으로 정제한 시료를 사용하여 HPLC법으로 aflatoxin을 분석할 수 있으며 그 분석 조건은 Table 2와 같다.

4) 면역학적 방법에 의한 분석방법

(1) Aflatoxin 유도체 제조

Antibody 생산을 위해 antigen으로 사용할 aflatoxin B_1의 항원성을 증폭시키기 위해 Chu 등의 방법으로 6-carboxymethyl-aflatoxin oxime(aflatoxin B_1 oxime)으로 유도체를 만든다.

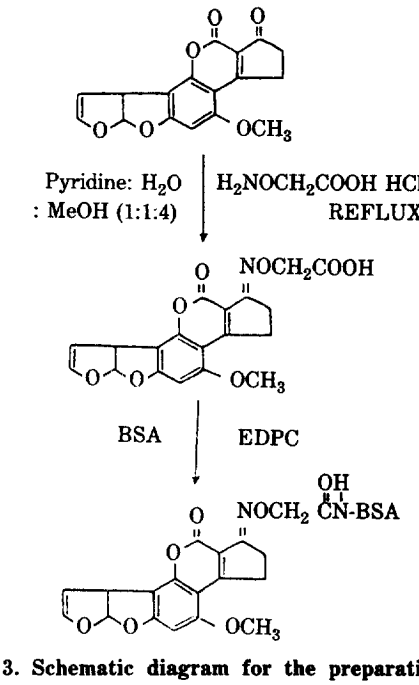

Fig. 3. Schematic diagram for the preparation of BSA-Afla B_1-oxime conjugate.

(2) Aflatoxin oxime과 protein의 conjugate 형성

Aflatoxin B_1 oxime은 bovine serum albumine 또는 horse radish peroxidase와 N-hydroxysuccinimide와 1,3-dicyclohexyl carbodiimide(DCCD)의 존재하에서 Fig. 3과 같이 형성한다.

(3) Aflatoxin 생성

Aflatoxin oxime-bovine serum albumin conjugate를 complete Freund's adjuvant와 유화시켜 1차 injection을 실시하고 일정 기간이 지난 다음 incomplete Freund's adjuvant와 유화시켜 booster injection을 필요에 따라 실시한다. 1차 injection 후부터 적당한 간격으로 blooding하면서 antibody titer를 실시하고 항체가가 높은 것은 유안 침전법으로 정제한다. 즉 상등액 반 정도의 포화 유안 용액을 magnetic stir로 교반하면서 1방울씩 떨어뜨려 serum을 침전시켜 원심분리하는 조작을 3번 이상 반복한다. 수거한 serum을 처음량의 PBS에 녹이고 3일간 4℃에서 투석시킨 다음 원심분리하여 침전물

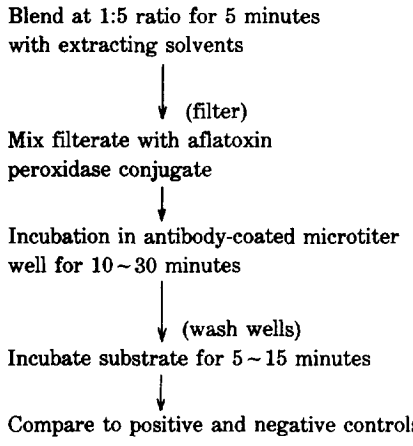

Fig. 4. Steps for simplified microtiter well ELISA of aflatoxin B_1.

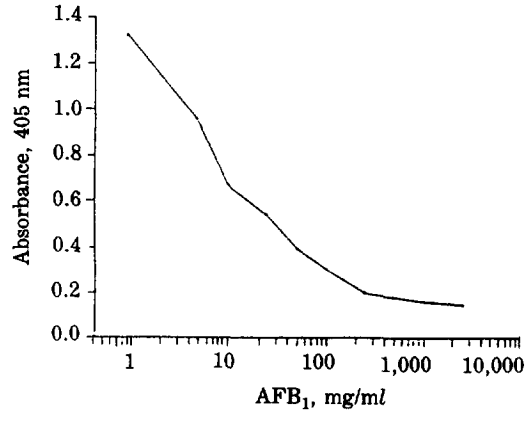

Fig. 5. Competitive direct ELISA standard curve for aflatoxin B_1.

을 버리고 antibody titer를 한 다음 감도가 높은 것은 1 ml씩 나누어 냉동 건조시켜 −20℃에 보관하면서 필요에 따라 실험에 사용한다.

(4) Antibody 반응 조건

Liu 등의 방법을 참조하여 반응 조건을 개선하기 위해 methanol, acetone 등의 각종 유기용매에 대한 peroxidase 저해 유무 등의 단계별 최적 반응을 조사하고 특히 antibody의 aflatoxin analogue에 대한 cross-reaction을 조사한다. 즉 aflatoxin B_1의 경우 aflatoxin B_2, aflatoxin M_1, aflatoxin M_2, aflatoxin G_1 및 aflatoxin G_2와의 cross activity를 조사하여 antibody의 항원에 대한 특이성을 검토한다.

(5) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

위의 결과를 Warner 등이 개발한 기술을 참고하여 antibody titer, antibody 특이성을 고려하여 aflatoxin B_1 함량측정조건을 확립한 결과는 다음과 같다. 즉 antibody를 적당히 희석시켜(1 : 500) microtiter plate에 125 ml씩 주입하여 40℃ 건조기에서 하룻밤 방치하여 coating한 다음 washing buffer로 씻는다. 시료를 마쇄한 후 methanol : H_2O(70 : 30) 혼합액을 시료의 4배가량 첨가하여 5분간 blending한 다음 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 여액을 분석용 시료로 사용한다. 이 시료와 aflatoxin B_1-oxime-HRP 최적희석액을 동일량 혼합하여 100 ml씩 well에 주입한 후 37℃에서 30분간 배양한다. Washing buffer로 다시 씻은 plate는 일정량의 기질(2,2-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)을 첨가하여 결합된 aflatoxin B_1-oxime-HRP를 발색시키고 10분 후 반응정지액 100 μl씩을 가해 반응을 정지시켜 ELISA reader로써 흡광도(405 nm)를 측정하여 미리 작성해둔 표준곡선과 비교하여 그 함량을 계산한다. 한편 표준곡선을 작성하기 위해 표준 aflatoxin B_1과 aflatoxin B_1-oxime-HRP 최적희석액을 동일량 혼합 후 100 μl씩 well에 주입한 후 37℃에서 30분간 배양한다. 그리고 앞서와 같은 조작으로 반응을 끝내고 ELISA reader로써 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성한 결과는 Fig. 5와 같다.

(6) Immunoaffinity-ELISA법

Minicolumn내에 충진되어 있는 sepharose 4B에 결합된 antibody에 시료를 처리하여 Fig. 6처럼 sample에 함유된 aflatoxin만 용출시킨 다음 이를 정제시료로 하여 상기의 ELISA법으로 aflatoxin 함량을 측정한다.

(7) Immunoaffinity-HPLC법에 의한 aflatoxin 정량

상기와 같이 affinity column을 통과하여 정제된 시료를 Table 2에서와 같은 HPLC 조건으로 aflatoxin을 정량하는 방법으로 sample속에 오염된 소량의 aflatoxin을 정확히 측량하는 개선된 분석방법이다. 참고로 영국의 MAFF(Ministry of Agriculture, Fisheries and Food)에서 땅콩 속의 aflatoxin 측정방법을 소개하면 다음과 같다.

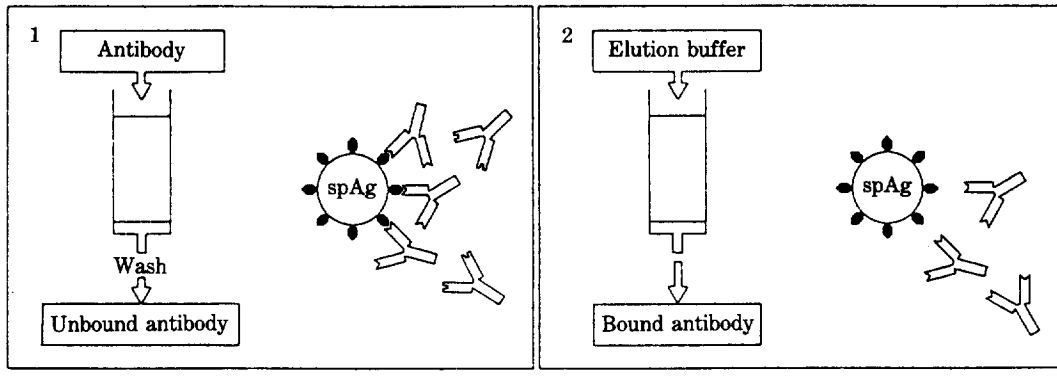

Fig. 6. Affinity chromatography.

Table 3. Maximum tolerance levels of aflatoxins in food and feeds

Country	Commodity	Tolerance (μg/kg)$_a$	Remarks
Australia	All food	5 (T)	Except peanuts and peanut products
	Peanut	15 (T)	
Canada	Nuts and nut products	15 (T)	Including peanuts
	Livestock feeds	20 (T)	
Colombia	Oilseed (peanuts)	10 (T)	
	Cereals, grains	30 (T)	
Denmark	Peanuts	10 (T)	
Finland	All foods	5 (T)	
F.R.G.	Nuts, cereals	5 (B)	
		10 (T)	
Hungary	All food	5 (B)	
India	All food	30 (B)	
Italy	Peanuts	50 (T)	
Japan	All food	NIL	Detection limit is arouds 10 (B)
	Mixed feeds	20 (B)	Nonlactating animals
	Mixed feeds	10 (B)	Lactating animals
Mexico	All food	20 (T)	
Netherlands	All food	5 (B)	
Thailand	All food	20 (T)	
U.K.	Nuts and nut products	10 (T)	
	Feeds	10 (B)	Lactating animals
	Feeds	20-50 (B)	Nonlactating animals
U.S.A.	All food	20 (T)	
	Mixed feeds	20 (T)	
	Cottonseed	300 (T)	Nonlactating animals

$_a$(T): total amounts of aflatoxin B_1, B_2, G_1, and G_2, (B): aflatoxin B_1.

Place 10.0+/-0.1g of peanut butter in a 100 mL flask with 30 mL of extraction solvent.

↓

Extract aflatoxin from samples either by shaking for 30 minutes or blending at high speed for 2 minutes, over a 10 miunte period.

↓

Add 45 mL of water, transfer to a centrifuge bottle and centrifuge at a temperature of not greater than 30°C until sedimentation is complete. Filter the supernatant.

↓

To 15 mL of the filtered supernatant add 135 mL of PBS.

↓

Pass 10 mL PBS down Easi-extract column.

↓

Pass 75 mL of the diluted filtrate down an "Easi-extract" column at a steady rate of about 10 mL/min. Wash column with 10 mL of distilled water. Elute aflatoxin from column with 2 mL of acetonitrile.

↓

Blow sample to near dryness under nitrogen.

↓

Carry out analysis by HPLC. Make sample back up to 0.5 mL with acetonitrile/water 20:80 v/v and pass through a 0.2μm filter. This gives a final samples concentration of 2g equivalents of peanut butter/mL. Quantify total aflatoxin levels by usual method.

Fig. 7. Immunoaffinity-HPLC method for the determination of aflatoxin in peanut buffer.

IV. 허용기준 설정

Aflatoxin이 동물이나 인체에 치명적인 위해를 줄 수 있는 가능성이 있기 때문에 많은 국가들이 aflatoxin에 대한 허용기준치를 정해오고 있다. 1987년 태국 방콕에서 개최된 mycotoxin에 대한 국제학술대회에서 Van Egmond는 50개국 이상이 식품이나 사료 중의 aflatoxin B_1 또는 total aflatoxin의 허용기준치를 Table 3과 같이 설정하고 있음을 보고한 바 있으며, 우리나라에서도 Table 4와 같이 사료원료 등에 대한 기준치가 있었고 1989년부터는 식품 중 aflatoxin 잠정 허용기준을 설정해 놓고 있다. 현재도 aflatoxin에 대한 허용기준치를 설정하고 있

Table 4. 식품 및 사료원료 중 aflatoxin 허용기준

대상	기준	비 고
식품	10 ppb	식품위생법 잠정기준
사료원료	50 ppb	사료관리법

는 나라는 증가하고 있으며 그 기준치도 대체로 5~20 ppb 수준을 유지하고 있다. 일부 국가에서는 우유나 유제품에서의 aflatoxin M_1의 잔류허용치를 설정해 놓고 있으나 국가간에 그 수준은 다양하다. 즉 Table 3에서 보는 바와 같이 유럽 각국은 미국보다 낮은 기준치를 보이고 있는데, aflatoxin M_1의 식품에서의 잔류허용치의 설정은 가축사료에서의 aflatoxin B_1의 법적 잔류량과 깊은 관계가 있다. 이와 같이 식품이나 사료에서의 aflatoxin 잔류에 대한 법적허용 기준설정은 보다 엄격해지고 aflatoxin의 잔류량을 더욱 낮은 수준으로 유지하려는 경향을 보이고 있다.

우리나라의 경우 식품에서는 10 ppb, 사료 원료에서는 50 ppb의 허용기준치를 보인 반면 일본의 경우는 공식적으로 인정된 검사 방법에 의해 식품에서는 검출이 안되어야 하며 사료에서도 10~20 ppb 이하로 정해 놓고 있다. 많은 유럽 국가들은 우유나 유제품, 특히 유아식품에서의 aflatoxin M_1에 대해서는 엄격한 규제를 하고 있으며 이러한 규제는 실질적으로 사료에서의 aflatoxin B_1의 허용잔류량에 대한 직접적인 규제로도 생각할 수 있다. 이에 반해 막대한 량의 농산물 수출국인 미국은 aflatoxin 허용기준치가 다른 나라에 비해 다소 높은 경향을 보이고 있어 국가간의 이해관계가 aflatoxin 허용기준치 설정에 영향을 주고 있음을 알 수 있다.

따라서 이러한 허용기준치 설정이 보다 과학적인 data에 근거하여 일률적으로 확립되어야 하며 이를 위해서 보다 간편하고 안전하며 신속한 분석 방법이 개발되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

V. 결 론

Aflatoxin의 측정은 다양한 방법이 가능하나 어느 특정한 방법이 모든 sample에 적용될 수 없고 sample과 경우에 따라 알맞은 측정법을 선택하고, 특히 면역학적기법 등의 새로운 기술도입으로 안전성이

보장된 간편한 방법이 계속적으로 개발되어야 할 것이다. 또한 aflatoxin 자체의 위험성을 고려하여 aflatoxin을 분석하거나 생성균의 분리 및 배양과정을 통해 철저한 안전성을 확보해야 되며 확실한 실험을 통한 법적규제 기준을 마련해야 할 것이다. 그러나 아무리 제도나 규제가 완벽하고 엄격할지라도 이를 뒷받침할 장기적 기술축적없이는 무의미하며, 따라서 과감한 연구비 투자와 연구시설의 확충으로 관련분야의 연구활성화를 도모하고 연구인력의 저변 확대로 지속적인 기술축적을 도모함으로써 강력한 제도적 규제의 집행을 가능하게 할 수 있을 것이다.

결론적으로 국민의 식품의 안전성에 대한 의식수준의 꾸준한 향상과 제도적 보완으로 안전성이 확보된 식품을 공급받을 수 있는 풍토가 조성되어야 하며 특히 연구의 활성화에 따른 분석기술 축적을 바탕으로 수입농산물의 경우 엄격한 수입규제와 검사시스템을 확보하여 국민보건향상은 물론 농산물 수입개방에 슬기롭게 대처해야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. M.R.A. Morgan and H.A. Lee: Mycotoxins and natural Food toxicants, Development and application of immunoassay for food analysis, 143-170 (1990).
2. S.J. Kershaw: Aflatoxins in imported edible nuts: some data 1982-84, *J. of Food Technology,* **20,** 647-649 (1985).
3. Tetsuhisa Goto: Mycotoxins: Current situation, *Food Reviews International,* **6**(2), 265-290 (1990).
4. Michael R.A. Morgan, Angray S. Kang and Henry W.S. Chan: Aflatoxin Determination in Peanut Butter by Enzyme-linked Immunosorbent Assay, *J. Sci. Food Agric.,* **37,** 908-914 (1986).
5. J.D. Groopman, L.J. Trudel, P.R. Donahue, Ann Marshak-Rothstein: High-affinity monoclonal antibodies for aflatoxins and their application to solid-phase immunoassays, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **81,** 7728-7731 (1984).
6. A.A.G. Candlish, C.A. Hayens and W.H. Stimson: Detetion and determination of aflatoxins using affinity chromatography, International *J. of Food Sci.* and *Technology,* **23,** 479-485 (1988).
7. Hans P. Van Egmond, W.E. Paulsch and E.A. Sizoo: Comparison of six method of analysis for the determination of aflatoxin B_1 in feeding stuffs containing cirtus pulp, *Food Additives* and *Contaminants,* **5**(3), 321-332 (1988).
8. P.M. Scott: Methods for determination of aflatoxin M_1 in milk products-a review of performance characteristic, *Food Additives* and *Contaminants,* **6**(3), 283-305 (1989).
9. H.P. Van Egmond: Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis, *Food Additives* and *Contaminants,* **6**(2), 139-188 (1989).
10. M. Sabino, A. Purchio and M.A.P. Zorzetto: Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of Sao Paulo, Brazil, *Food Additives* and *Contaminants,* **6**(2), 321-326 (1989).
11. David M. Wilson: Analytical Methods for Aflatoxins in Corn and Peanuts, *Arch. Environ. Contam. Toxicol,* **18,** 308-314 (1989).