# Biologische Aktivität der Detoxifikationsprodukte von ($^{1}$C)-Aflatoxin B bei der Ammoniakbehandlung = Biological activity of ($^{1}$C)-aflatoxin B degradation products obtained during ammonia detoxification

Autor(en): **Schroeder, T. / Lüthy, J. / Sagelsdorff, P.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **72 (1981)**

Heft 1

PDF erstellt am: **28.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-984602

**Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

**Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

**http://www.e-periodica.ch**

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 72, 62–70 (1981)

*T. Schroeder, J. Lüthy, P. Sagelsdorff, U. Zweifel, U. Friederich* und *Ch. Schlatter,* Institut für Toxikologie der ETH und Universität Zürich, Schwerzenbach

# Biologische Aktivität der Detoxifikationsprodukte von ($^{14}$C)-Aflatoxin $B_1$ bei der Ammoniakbehandlung

Biological Activity of ($^{14}$C)-Aflatoxin $B_1$ Degradation Products Obtained during Ammonia Detoxification

## Einleitung

Seit die Aflatoxine durch ihre außergewöhnlich starke Toxizität und Karzinogenität die Aufmerksamkeit auf sich zogen, sind große Anstrengungen zu ihrer Kontrolle in der menschlichen Nahrung unternommen worden. Das Hauptgewicht wurde dabei auf eine möglichst weitgehende Vermeidung der Schimmelbildung gelegt, die, gepaart mit geeigneten Sortiermethoden, die Aflatoxinbelastung auf ein Minimum reduziert (1, 2).

Für die Tiernahrung forscht man im Gegensatz dazu vor allem nach kostengünstigen Dekontaminationsmethoden, die akut toxische Aflatoxingehalte in Futtermitteln auf ein tragbares Maß bringen. Physikalische, mikrobielle und Extraktionsmethoden erlauben keine kostengünstige Senkung des Aflatoxingehalts ohne Einbuße an Futterqualität. Effektiver in der Zerstörung der Aflatoxine sind chemische Methoden. Praktische Bedeutung als Dekontaminantien haben bis heute nur die gasförmigen Basen Ammoniak und Methylamin erhalten, weil sie einfach anzuwenden sind und alle natürlichen Aflatoxine anzugreifen scheinen (3). Der Zusatz von zwei Prozent Ammoniak zu aflatoxinhaltigen Futtermitteln ergibt schon bei Raumtemperatur eine gute Dekontamination. Noch geringere Konzentrationen dienen außerdem zur prophylaktischen Hemmung von aflatoxinproduzierenden Aspergillen (4).

## Biologische Aktivität der Aflatoxin-Folgeprodukte

Die in der Literatur beschriebenen Versuche zur biologischen Aktivität von ammoniakdekontaminierten, aflatoxinverseuchten Futtermitteln zeigen, daß durch die Ammoniakbehandlung die akute und subakute Toxizität drastisch herabgesetzt wird (5, 6, 7). In bezug auf die Langzeittoxizität stellen sich die folgenden Fragen:

1. Entstehen bei der Ammoniakdekontamination karzinogene Produkte, die in Nahrungsmittel tierischer Herkunft übertragen werden könnten?
2. Sind nach der Dekontamination noch Karzinogene vorhanden, die eine Verwendung dieser Dekontaminationsmethode für menschliche Nahrungsmittel verbieten?

Punkt 2 könnte eine Bedeutung erlangen in tropischen Ländern, deren Hauptnahrungsquelle Mais darstellt.

Eine gewisse Auskunft über die Karzinogenität der Dekontaminationsprodukte liefert eine über ein Jahr geführte Fütterungsstudie an Forellen (8), während welcher der im Futter vorhandene Gehalt an Aflatoxin $B_1$ von 400 ppb bei 53 von 55 Tieren (96,4%) Leberkarzinome induzierte. Die Gruppe mit identischem, aber zusätzlich einer Ammoniakbehandlung unterworfenem Mais zeigte dagegen nicht mehr Hepatome als die Kontrollgruppe. Da 0,4 ppb Aflatoxin $B_1$ in einem ähnlichen Versuch eine Inzidenz von 14% erzeugten (9), ist die Karzinogenität um mindestens den Faktor 100 reduziert worden. Die Aussagekraft dieses Versuchs ist dadurch eingeschränkt, daß die Forelle ein unübliches Versuchstier darstellt und sich als Kaltblüter in Stoffwechsel und Reaktionsweise gegenüber Chemikalien anders verhält als das Säugetier, wodurch die Extrapolation auf die Situation des Menschen wesentlich erschwert wird.

Zur Beurteilung der Karzinogenität für Warmblüter suchten wir nach zusätzlichen Informationen. In einem eigenen Versuch prüften wir die Mutagenität der bei der Ammoniakbehandlung entstehenden Aflatoxinabbauprodukte an Bakterien im Ames-Test; dieser Test wurde mit vielen bekannten Säugetierkarzinogenen auf seine prädiktive Eignung geprüft und für recht gut befunden. Künstlich mit 7,5 ppm Aflatoxin $B_1$ kontaminierter Mais wurde in einem gasdichten Kolben während 4 Wochen bei 25 °C in Gegenwart von Ammoniak inkubiert.

Die methylenchloridlöslichen Stoffe wurden dünnschichtchromatographisch von Aflatoxin $B_1$ befreit und in Dimethylsulfoxid für den Ames-Test mit den Stämmen *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 verwendet. Bei den eingesetzten Mengen konnte keine mutagene Wirkung festgestellt werden (Abb. 1).

Die größte aufgetragene Dosis entsprach 3,7 $\mu$g Aflatoxin $B_1$ pro Platte vor der Dekontamination, die beiden anderen geprüften Werte 0,37 und 0,037 $\mu$g. Die festgestellten Revertantenzahlen lagen nicht signifikant über dem Spontanwert. Die positive Kontrolle mit 0,1 $\mu$g $AFB_1$ ergab die erwarteten Werte (10). Bei einer Menge von weniger als 0,01 $\mu$g Aflatoxin $B_1$ pro Platte kann keine Mutagenität mehr beobachtet werden (11). Die Mutagenität der methylenchloridlöslichen Zersetzungsprodukte ist somit um mindestens den Faktor 370 geringer als jene von $AFB_1$.

Fehlende Mutagenität bedeutet noch nicht unbedingt Ungefährlichkeit des dekontaminierten Futters, da nur eine geringe quantitative Korrelation zwischen Mutagenität und Karzinogenität besteht (12, 13). Als weitere Methode zur Erkennung einer noch vorhandenen Karzinogenität in den bei der Dekontamination aus Aflatoxin $B_1$ entstandenen Produkten benützten wir die Bestimmung von deren

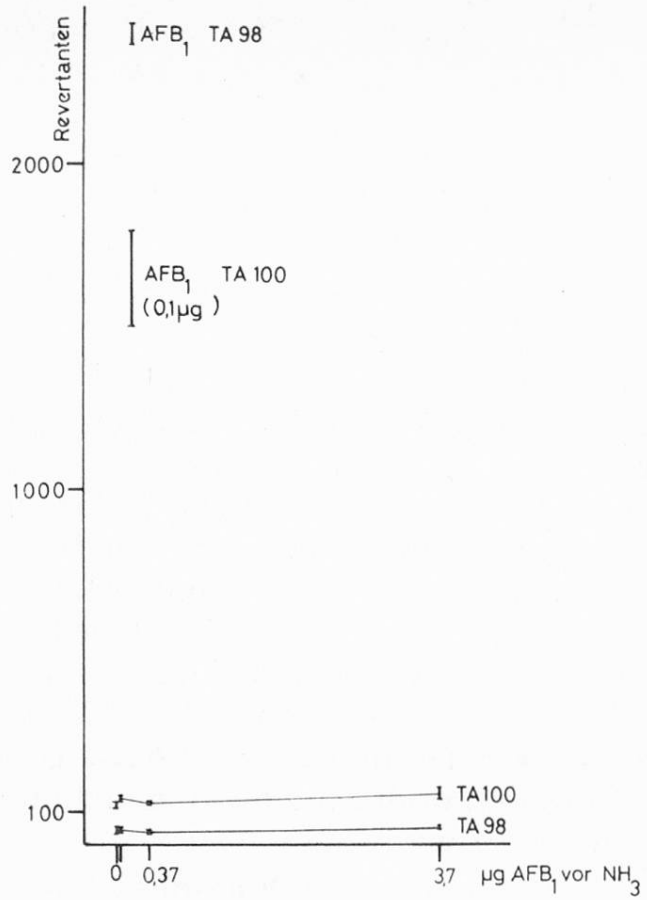


*Abb. 1.* Mutagenität nach Ames
Vergleich der $AFB_1$-induzierten $his^+$-Revertantenzahlen mit jenen des $CH_2Cl_2$-Extraktes von 30 Tage lang mit $NH_3$-behandeltem, $AFB_1$-haltigem Mais für die $his^-$-Bakterienstämme Salmonella typhimurium TA 98 und TA 100

DNS*-Bindungsfähigkeit (14) in vivo. Das Maß für die DNS-Bindungsfähigkeit, der «Covalent Binding Index» (CBI), wird definiert als das Verhältnis des an DNS kovalent gebundenen Anteils einer Substanz und zugehöriger Metaboliten zur eingesetzten Dosis und läßt sich anhand der folgenden Formel berechnen:

$$CBI = \frac{\text{Mikromol gebundene Substanz / mol DNS-Nukleotide}}{\text{Millimol verabreichte Substanz / kg Körpergewicht}}$$

$$CBI = \frac{\text{dpm** gebunden / mg DNS}}{\text{dpm verabreicht / kg Körpergewicht}} \times \frac{1}{3{,}24 \times 10^{-9}}$$

Der CBI erlaubt eine grobe Klassierung von Substanzem in starke, mittlere und schwache Karzinogene. Die starken Karzinogene Aflatoxin $B_1$ und Dimethylnitrosamin beispielsweise besitzen CBI-Werte in der Größenordnung $10^4$, während ein eher schwaches Karzinogen wie Tetrachlorkohlenstoff einen CBI unter 100 aufweist. Der CBI von Aflatoxin $M_1$ ist kürzlich an der Ratte gemessen worden (15); er beträgt ungefähr einen Fünftel des CBI von Aflatoxin $B_1$. Die Korrelation zur kar-

* DNS = Desoxyribonukleinsäure ** dpm = disintegrations per minute

zinogenen Potenz ist in diesem Falle recht gut. Ein allzu genauer Vergleich ist allerdings nicht möglich, da bereits die Streuung der CBI-Werte von Tier zu Tier groß ist und auch zwischen einzelnen Tierstämmen starke Unterschiede bezüglich CBI und Karzinominzidenz bestehen können. Außerdem kann der CBI-Wert wegen des geringen an DNS bindenden Anteils der Gesamtdosis meist nur mit radioaktiv markierten Substanzen bestimmt werden.

In einem orientierenden Experiment wurde eine Maisprobe mit $^{14}C$-markiertem Aflatoxin $B_1$ auf einen Gehalt von 6,6 ppm gebracht und während zwei Wochen einer Ammoniakbehandlung unterworfen. Das Material wurde hierauf mit Chloroform und anschließend mit Wasser extrahiert. Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Markierung auf die verschiedenen Fraktionen.

*Tabelle 1.* Radioaktivitätsverteilung von ($^{14}C$)-Aflatoxin $B_1$ auf Mais nach 14 Tagen Ammoniakbehandlung / CBI-Werte einzelner Fraktionen

| | $\%^{14}C$ | $\%^{14}C$ | CBI |
|---|---|---|---|
| CHLOROFORMEXTRAKT | 11,4% | | |
| DC – $AFB_1$-Zone | | 5,1% | |
| DC – Resteluat | | 2,5% | < 462 / < 265 |
| WASSEREXTRAKT* | 45,0% | | 1024 / 916 |
| MAISRUECKSTAND | 43,1% | | 1256 / 855 |

* Nach $CHCl_3$-Extraktion

Die chloroformlöslichen Anteile wurden dünnschichtchromatographisch von Aflatoxin $B_1$ befreit, eingeengt und als Suspension in 12%igem Aethanol oral an zwei Ratten verabreicht. Die verbliebenen 2,5% der eingesetzten Radioaktivität erlauben wegen der für diese geringe Aktivität hohen Nachweisgrenze nur die Aussage, daß der CBI unter 450 liegen muß. Dies ist mit dem Resultat des Ames-Tests vereinbar. Die wasserlösliche Fraktion (45% der eingesetzten Radioaktivität) wurde lyophilisiert und als wässerige Suspension oral an zwei Ratten gegeben. Sie ergab einen erstaunlich hohen CBI-Wert von rund 1000, obschon sie gemäß Radio-HPLC weniger als 0,73% freies Aflatoxin $B_1$ enthielt. Der nach der Extraktion verbleibende Rückstand (43,1% der eingesetzten Radioaktivität) konnte direkt an zwei Ratten verfüttert werden und ergab ebenfalls einen CBI-Wert von rund 1000, doch ist nicht auszuschließen, daß ein Teil des Aflatoxin $B_1$ wegen starker Adsorption am Mais nicht extrahiert werden konnte.

Die erhaltenen Resultate weisen darauf hin, daß bei der Ammoniakbehandlung zum Teil wasserlösliche Aflatoxinfolgeprodukte entstehen, die wahrscheinlich ebenfalls karzinogen sind.

## Chemische Grundlagen der Ammoniakbehandlung

Die Strukturen der auf Mais aus Aflatoxin $B_1$ entstehenden Zersetzungsprodukte sind teilweise noch unbekannt (16). Reines Aflatoxin $B_1$ liefert mit wässerigem Ammoniak bei erhöhter Temperatur im Bombenrohr als Hauptprodukte zwei Substanzen, für welche die folgenden Strukturvorschläge (17) gemacht werden (Abb. 2).

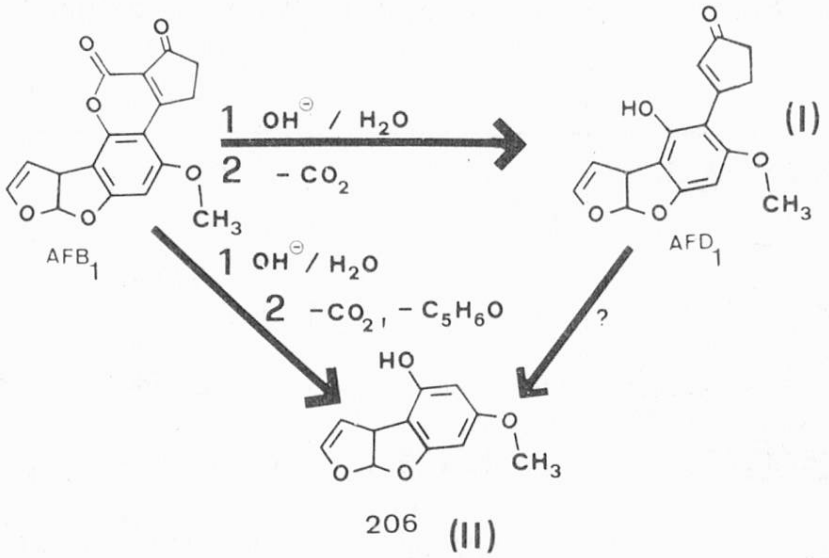


*Abb. 2.* Zersetzung von Aflatoxin $B_1$ in Gegenwart von Basen

Die Öffnung des Delta-Lactonringes in $AFB_1$ wird nahegelegt durch die reversible Veränderung des Coumarin-Chromophors mit Basen (18). Durch Decarboxylierung entsteht ein Aflatoxin $D_1$ benanntes Produkt, für welches aufgrund von Massen-, Infrarot- und UV-Spektren die Struktur (I) postuliert wird (17). Aflatoxin $D_1$ enthält wie auch das zweite gefundene Produkt (II) mit der Vinyläthergruppierung an den Stellen acht und neun das für die Karzinogenität wesentliche Strukturelement (19), so daß eine karzinogene Wirkung dieser Stoffe nicht überraschend wäre.

Da mit den bekannten spektroskopischen Daten (17) die Lage der Doppelbindung im Cyclopentenonteil von Aflatoxin $D_1$ nicht eindeutig festgelegt werden kann, wiederholten wir den beschriebenen Charakterisierungsversuch und konnten durch zusätzliche Aufnahme des $^1$H-Kernresonanzspektrums die Struktur (I) vollumfänglich bestätigen. Die von Aflatoxin $D_1$ und der Verbindung mit m/e = 206 (II) erhaltenen Massenspektren stimmen mit den von *Lee* und *Cucullu* beschrie-

benen (17) überein. Für diesen Versuch setzten wir tritiummarkiertes Aflatoxin $B_1$ (biosynthetisch hergestellt) ein und konnten so gleichzeitig die in Tabelle 2 zusammengestellte Radioaktivitätsverteilung bestimmen.

*Tabelle 2.* Verteilung der Radioaktivität von $^3$H-Aflatoxin $B_1$ nach 4 h Bombenrohr / 100 °C in Gegenwart von konzentriertem Ammoniak

| | % $^3$H | % $^3$H |
|---|---|---|
| LYOPHILISAT | 24,0% | |
| DICHLORMETHAN (neutral) | 49,6% | |
| DC — $AFD_1$ | | 30,7% |
| DC — M =206 | | 3% |
| DC — Polare Stoffe | | 14,1% |
| DICHLORMETHAN (alkalisch) | 0,6% | |
| WASSERPHASE (alkalisch) | 24,7% | |
| AETHER[1)] (sauer) | 10,1% | |

[1)] Nach neutraler und alkalischer $CH_2Cl_2$-Extraktion

Durch Elimination oder Tritium/Wasserstoffaustausch wurden 24% der Radioaktivität flüchtig. 49,6% traten beim Schütteln in die Methylenchloridphase. Im Radiodünnschichtchromatogramm wurden 30,7% der Totalaktivität als Aflatoxin $D_1$ isoliert und 3% in der Zone, die der Verbindung mit der Masse 206 zugeschrieben wird. Als Retention blieben 14%. Die Struktur der wasserlöslichen Verbindungen, die aufgrund der Resultate unseres DNS-Bindungsversuches eine beträchtliche Karzinogenität besitzen dürften, ist noch völlig unbekannt. Diese Versuche zeigen, daß bessere Kenntnisse über Struktur und Verbleib der bei der Ammoniakbehandlung aus Aflatoxinen gebildeten Substanzen sowie deren Karzinogenität nötig sein werden, um die Gefährlichkeit der Ammoniakdekontaminationsprodukte beurteilen zu können.


## *Dank*

Den Herren Dres. *B. Zimmerli* und *F. Friedli*, Bundesamt für Gesundheitswesen, danken wir herzlich für die massenspektroskopische Untersuchung unserer Substanzen. Herr *F. Bangerter* vom Institut für technische Chemie ETH hat durch Entkopplungsexperimente die Zuordnung sämtlicher Signale im $^1$H-Kernresonanzspektrum ermöglicht, wofür ihm ebenfalls bestens gedankt sei.

## *Zusammenfassung*

Maisgrieß mit 6,5 ppm $^{14}C$-$AFB_1$ wurde mit 2,1% $NH_3$ versetzt und bei 25 °C 14 Tage inkubiert. Der mittels DC von $AFB_1$ befreite Chloroformextrakt, der Wasserextrakt und der verbleibende Maisrückstand wurden auf In-vivo-Bindung an Rattenleber-DNS untersucht. Die erhaltenen CBI-Werte zeigen eine Herabsetzung der DNS-Bindungsaktivität durch $NH_3$, weisen aber auf das Vorhandensein von ebenfalls an DNS bindenden Substanzen im Wasserextrakt (freies $AFB_1$ weniger als 0,73%) und auf dem verbliebenen Mais hin. Die in Dichlormethan löslichen Anteile von mit $AFB_1$ angereichertem und anschließend mit $NH_3$ behandeltem Mais zeigten nach Abtrennung verbliebener Ausgangssubstanz im Ames-Test mit den Bakterienstämmen *S. typhimurium* TA 98 und TA 100 gegenüber der eingesetzten Menge $AFB_1$ eine um mindestens den Faktor 370 kleinere Mutagenität. Die Ammoniakbehandlung von tritiummarkiertem $AFB_1$ ergab folgende Verteilung der Radioaktivität: $CH_2Cl_2$-Extrakt (neutral) 49,6%; $CH_2Cl_2$-Extrakt (alkalisch) 0,6%; Wasser (alkalisch) 24,7%; Aetherextrakt (sauer) 10,1%. Die Struktur des zu 30,7% gebildeten und bereits durch MS-, UV- und IR-Spektren beschriebenen Hauptprodukts Aflatoxin $D_1$ konnte durch $^1H$-NMR verifiziert werden.



## *Résumé*

Du maïs moulu, enrichi avec 6,5 ppm d'aflatoxine $B_1$ marquée au $^{14}C$ a été incubé avec 2,1% de $NH_3$ à 25 °C pendant 14 jours. La liaison covalente à l'ADN fut examinée dans l'extrait chloroformique après élimination de l'$AFB_1$ restante par CCM dans l'extrait aqueux et dans le maïs soumis aux extractions. Les valeurs CBI trouvées indiquent une liaison à l'ADN diminuée par le traitement à l'$NH_3$; parallèlement des substances de liaison à l'ADN ont été trouvées dans l'extrait aqueux (moins de 0,73% d'$AFB_1$ libre) et dans le maïs. La partie soluble dans le $CH_2Cl_2$ de maïs enrichi en $AFB_1$ et traité à l'$NH_3$ a montré dans le test selon Ames sur *Salmonella typhimurium* TA 98 et TA 100 une action mutagène 370 fois plus faible que celle de l'$AFB_1$. Après traitement à l'$NH_3$, la radioactivité d'$AFB_1$ marqué au tritium par biosynthèse se répartissait comme suit: extrait $CH_2Cl_2$ (neutre) 49,6%; extrait $CH_2Cl_2$ (basique) 0,6%; eau (basique) 24,7%; extrait éther diéthylique (acide) 10,1%. La structure proposée à base de spectres de masse, UV et IR du principal produit formé, soit l'aflatoxine $D_1$ (30,7%), fut confirmée par $^1H$-RMN.



## *Summary*

Ground corn with 6.5 ppm $^{14}C$-$AFB_1$was incubated with 2.1% $NH_3$ for two weeks at 25 °C. In vivo covalent binding to rat liver DNA was determined for the $CHCl_3$-soluble portion (remaining $AFB_1$ removed by thinlayer chromatography), the water-soluble part and the remaining corn. The CBI-values (Covalent Binding Index) obtained indicate a decrease of DNA-binding activity due to $NH_3$, but also show the appearance of DNA-binding substances in the water-soluble part (free $AFB_1$ less than 0.73%) and on the remaining corn. The $CH_2Cl_2$-soluble fraction extracted from a corn sample enriched with $AFB_1$ and subsequently ammoniated, was tested for its mutagenicity by the Ames test with *S. typhimurium* TA 98 and TA 100 (remaining $AFB_1$ removed by t. l. c. prior to mutagenicity testing). Mutagenicity was smaller by at least a factor of 370 with respect to the $AFB_1$ present before ammoniation. In the ammoniation-product of $^3H$-$AFB_1$ (biosynthetically labelled) the following distribution of

radioactivity was obtained: $CH_2Cl_2$ (neutral) 49.6%; $CH_2Cl_2$ (basic) 0.6%; water (basic) 24.7%; diethylether (acidic) 10.1%. The structure of the main product, aflatoxin $D_1$ (30.7%), was found by $^1$H-NMR to be correct as proposed on the grounds of mass-, UV- and IR-spectroscopy.

## *Literatur*


1. *Dollear, F. G.:* Detoxification of aflatoxins in foods and feeds. In: L. A. Goldblatt, aflatoxin, pp. 359—391. Food Science and Technology Monographs. Academic Press, New York 1969.
2. *Goldblatt, L. A.* and *Dollear, F. G.:* Detoxification of contaminated crops. In: J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine and M. A. Melham, mycotoxins, pp. 139—150. Pathotox Publ. Inc., Park Forest South 1977 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart).
3. *Brekke, O. L., Peplinski, A. J., Nofsinger, G. W., Conway, H. F., Stringfellow, A. C., Montgomery, R. R., Silman, R. W., Sohns, V. E.* and *Bagley, E. B.:* Aflatoxin inactivation in corn by ammonia gas: A field trial. Trans. ASAE **22**, 425—432 (1979).
4. *Nofsinger, G. W., Bothast, R. J., Lancaster, E. B.* and *Bagley E. B.:* Ammonia suplemented ambient temperature drying of high-moisture corn. Trans. ASAE **20**, 1151—1159 (1977).
5. *Norred, W. P.:* Effect of ammoniation on the toxicity of corn artificially contaminated with aflatoxin $B_1$. Toxicol. Appl. Pharmacol **51**, 411—416 (1979).
6. *Mann, G. E., Gardner, H. K. Jr., Booth, A. N.* and *Gumbmann, M. R.:* Aflatoxin inactivation. Chemical and biological properties of ammonia and methylamine treated cottonseed meal. J. Agric. Food. Chem. **19**, 1155—1158 (1971).
7. *Brekke, O. L., Peplinski, E. B.* and *Lancaster, E. B.:* Aflatoxin inactivation in corn by aqua ammonia. Trans. ASAE **20**, 1160—1168 (1977).
8. *Brekke, O. L. Sinnuber, R. O., Peplinski, A. J., Wales, J. H., Putnam, G. B., Lee, D. J.* and *Ciegler, A.:* Aflatoxin in corn: Ammonia inactivation and bioassay with rainbow trout. Appl. Environment. Microbiol. **34**, 34—37 (1977).
9. *Lee, D. J., Wales, J. H., Ayres, J. L.* and *Sinnhuber, R. O.:* Synergism betwen cyclopropenoid fatty acids and chemical carcinogens in rainbow trout (Salmo gairdneri). Cancer Res. **28**, 2312—2318 (1968).
10. *McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E.* and *Ames, B. N.:* Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella / microsome test: Assay of 300 chemicals . Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **72**, 5135—5139 (1975).
11. *Ames, B. N., McCann, J.* and *Yamasaki, E.:* Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella / mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res. **31**, 347—364 (1975).
12. *Wong, J. J.* and *Hsieh, D. P. H.:* Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **73**, 2241—2244 (1976).
13. *Sinnhuber, R. O., Lee, D. J., Wales, J. H., Landers, M. K.* and *Keyl, A. C.:* Hepatic carcinogenesis of aflatoxin $M_1$ in rainbow trout (Salmo gairdneri) and its enchancement by cyclopropene fatty acids. J. Natl. Cancer Inst. **53**, 1285—1288 (1974).
14. *Lutz, W. K.:* In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. Mutat. Res. **65**, 289—356 (1979).
15. *Lutz, W. K., Jaggi, W., Lüthy, J. Sagelsdorff, P.* and *Schlatter, C.:* In vivo covalent binding of aflatoxin $B_1$ and aflatoxin $M_1$ to liver DNA of rat, mouse and pig. Chem.-Biol. Interactions **32**, 244—256 (1980).
16. *Beckwith, A. C., Vesonder R. F.* and *Ciegler, A.:* Action of weak bases upon aflatoxin $B_1$ in contact with macromolecular reactants. J. Agric. Food Chem. **23**, 582—587 (1975).

17. *Cucullu, A. F., Lee, L. S., Pons, W. A., Jr.* and *Stanley, J. B.:* Ammoniation of aflatoxin $B_1$. Isolation and characterization of a product with molecular weight 206. J. Agric. Food Chem. **24**, 408–410 (1976).
18. *Kiermeier, F.* und *Ruffer, L.:* Veränderung von Aflatoxin $B_1$ in alkalischer Lösung. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **155**, 129–141 (1974).
19. *Wogan, G. N., Edwards, G. S.* and *Newberne, P. M.:* Structure – activity relationships in toxicity and carcinogenity of aflatoxins and analogs. Cancer Res. **31**, 1936–1942 (1971).

Dr. T. Schroeder
Institut für Toxikologie der
Eidg. Techn. Hochschule und
der Universität Zürich
Schorenstraße 16
*CH-8603 Schwerzenbach*