

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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 72 (1981)

Heft: 1

Artikel: Biologische Aktivität der Detoxifikationsprodukte von (¹C)-Aflatoxin B bei der Ammoniakbehandlung = Biological activity of (¹C)-aflatoxin B degradation products obtained during ammonia detoxification

Autor: Schroeder, T. / Lüthy, J. / Sagelsdorff, P.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-984602>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 29.11.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

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 (¹⁴C)-Aflatoxin B₁ bei der Ammoniakbehandlung

Biological Activity of (¹⁴C)-Aflatoxin B₁ 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 B₁ 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 B₁ 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 B₁ 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 B₁ 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 µg Aflatoxin B₁ pro Platte vor der Dekontamination, die beiden anderen geprüften Werte 0,37 und 0,037 µg. Die festgestellten Revertanzahlen lagen nicht signifikant über dem Spontanwert. Die positive Kontrolle mit 0,1 µg AFB₁ ergab die erwarteten Werte (10). Bei einer Menge von weniger als 0,01 µg Aflatoxin B₁ 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 AFB₁.

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 B₁ entstandenen Produkten benützten wir die Bestimmung von deren

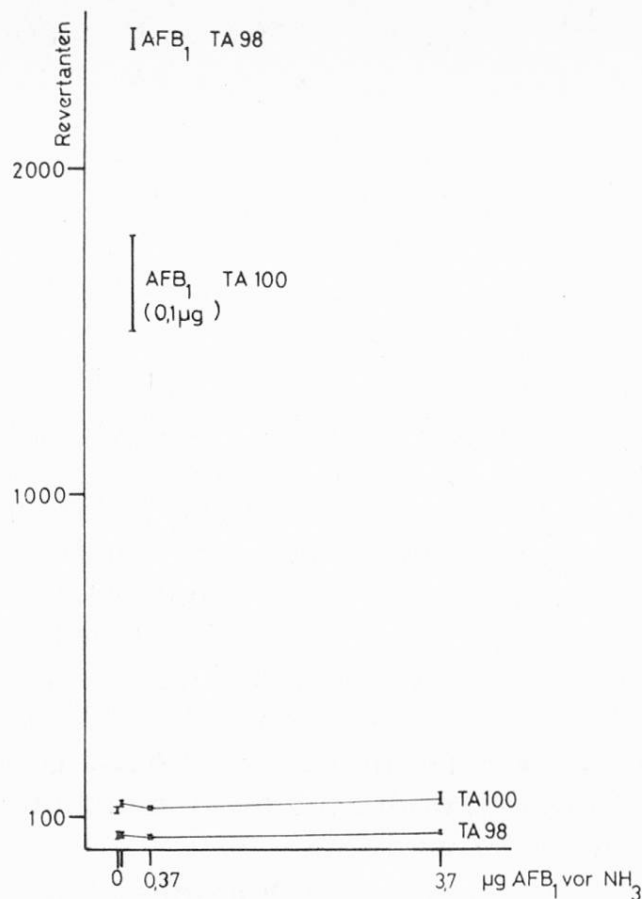


Abb. 1. Mutagenität nach Ames

Vergleich der AFB₁-induzierten his⁺-Revertanzahlen mit jenen des CH₂Cl₂-Extraktes von 30 Tage lang mit NH₃-behandeltem, AFB₁-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:

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

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

Der CBI erlaubt eine grobe Klassierung von Substanzen in starke, mittlere und schwache Karzinogene. Die starken Karzinogene Aflatoxin B₁ und Dimethylnitrosamin beispielsweise besitzen CBI-Werte in der Größenordnung 10⁴, während ein eher schwaches Karzinogen wie Tetrachlorkohlenstoff einen CBI unter 100 aufweist. Der CBI von Aflatoxin M₁ ist kürzlich an der Ratte gemessen worden (15); er beträgt ungefähr einen Fünftel des CBI von Aflatoxin B₁. 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

	$\%^{14}\text{C}$	$\%^{14}\text{C}$	CBI
<u>CHLOROFORMEXTRAKT</u>	11,4%		
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 10px;">DC</div> <div style="margin-right: 10px;">/</div> <div style="margin-right: 10px;">AFB₁-Zone</div> </div>		5,1%	
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 10px;">DC</div> <div style="margin-right: 10px;">/</div> <div>Resteluat</div> </div>		2,5%	< 462 / < 265
<u>WASSEREXTRAKT*</u>	45,0%		1024 / 916
<u>MAISRUECKSTAND</u>	43,1%		1256 / 855

* Nach CHCl_3 -Extraktion

Die chloroformlöslichen Anteile wurden dünnschichtchromatographisch von Aflatoxin B_1 befreit, eingengt 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 wässrige 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 B₁ entstehenden Zersetzungsprodukte sind teilweise noch unbekannt (16). Reines Aflatoxin B₁ liefert mit wässrigem Ammoniak bei erhöhter Temperatur im Bombenrohr als Hauptprodukte zwei Substanzen, für welche die folgenden Strukturvorschläge (17) gemacht werden (Abb. 2).

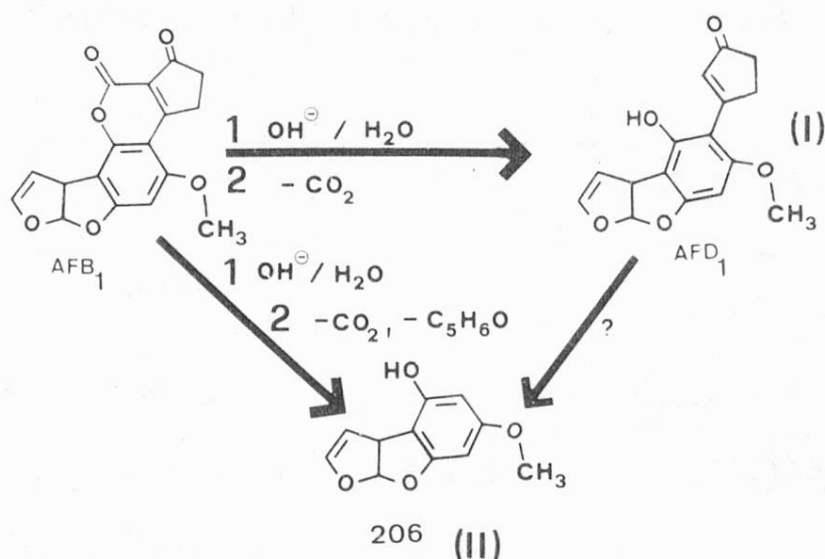


Abb. 2. Zersetzung von Aflatoxin B₁ in Gegenwart von Basen

Die Öffnung des Delta-Lactonringes in AFB₁ wird nahegelegt durch die reversible Veränderung des Coumarin-Chromophors mit Basen (18). Durch Decarboxylierung entsteht ein Aflatoxin D₁ benanntes Produkt, für welches aufgrund von Massen-, Infrarot- und UV-Spektren die Struktur (I) postuliert wird (17). Aflatoxin D₁ 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 D₁ nicht eindeutig festgelegt werden kann, wiederholten wir den beschriebenen Charakterisierungsversuch und konnten durch zusätzliche Aufnahme des ¹H-Kernresonanzspektrums die Struktur (I) vollumfänglich bestätigen. Die von Aflatoxin D₁ 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 B₁ (biosynthetisch hergestellt) ein und konnten so gleichzeitig die in Tabelle 2 zusammengestellte Radioaktivitätsverteilung bestimmen.

Tabelle 2. Verteilung der Radioaktivität von ³H-Aflatoxin B₁ nach 4 h Bombenrohr / 100 °C in Gegenwart von konzentriertem Ammoniak

	% ³ H	% ³ H
<u>LYOPHILISAT</u>	24,0%	
<u>DICHLORMETHAN</u> (neutral)	49,6%	
DC $\begin{cases} \text{AFD}_1 \\ \text{M} = 206 \\ \text{Polare Stoffe} \end{cases}$		30,7%
		3%
		14,1%
<u>DICHLORMETHAN</u> (alkalisch)	0,6%	
<u>WASSERPHASE</u> (alkalisch)	24,7%	
<u>AETHER</u> ¹⁾ (sauer)	10,1%	

¹⁾ Nach neutraler und alkalischer CH₂Cl₂-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 D₁ 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 ¹H-Kernresonanzspektrum ermöglicht, wofür ihm ebenfalls bestens gedankt sei.

Zusammenfassung

Maisgrieß mit 6,5 ppm ^{14}C -AFB₁ wurde mit 2,1% NH₃ versetzt und bei 25 °C 14 Tage inkubiert. Der mittels DC von AFB₁ 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 NH₃, weisen aber auf das Vorhandensein von ebenfalls an DNS bindenden Substanzen im Wasserextrakt (freies AFB₁ weniger als 0,73%) und auf dem verbliebenen Mais hin. Die in Dichlormethan löslichen Anteile von mit AFB₁ angereichertem und anschließend mit NH₃ behandeltem Mais zeigten nach Abtrennung verbliebener Ausgangssubstanz im Ames-Test mit den Bakterienstämmen *S. typhimurium* TA 98 und TA 100 gegenüber der eingesetzten Menge AFB₁ eine um mindestens den Faktor 370 kleinere Mutagenität. Die Ammoniakbehandlung von tritiummarkiertem AFB₁ ergab folgende Verteilung der Radioaktivität: CH₂Cl₂-Extrakt (neutral) 49,6%; CH₂Cl₂-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 D₁ konnte durch ^1H -NMR verifiziert werden.

Résumé

Du maïs moulu, enrichi avec 6,5 ppm d'aflatoxine B₁ marquée au ^{14}C a été incubé avec 2,1% de NH₃ à 25 °C pendant 14 jours. La liaison covalente à l'ADN fut examinée dans l'extrait chloroformique après élimination de l'AFB₁ 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'NH₃; parallèlement des substances de liaison à l'ADN ont été trouvées dans l'extrait aqueux (moins de 0,73% d'AFB₁ libre) et dans le maïs. La partie soluble dans le CH₂Cl₂ de maïs enrichi en AFB₁ et traité à l'NH₃ 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'AFB₁. Après traitement à l'NH₃, la radioactivité d'AFB₁ marqué au tritium par biosynthèse se répartissait comme suit: extrait CH₂Cl₂ (neutre) 49,6%; extrait CH₂Cl₂ (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 D₁ (30,7%), fut confirmée par ^1H -RMN.

Summary

Ground corn with 6.5 ppm ^{14}C -AFB₁ was incubated with 2.1% NH₃ for two weeks at 25 °C. In vivo covalent binding to rat liver DNA was determined for the CHCl₃-soluble portion (remaining AFB₁ 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 NH₃, but also show the appearance of DNA-binding substances in the water-soluble part (free AFB₁ less than 0.73%) and on the remaining corn. The CH₂Cl₂-soluble fraction extracted from a corn sample enriched with AFB₁ and subsequently ammoniated, was tested for its mutagenicity by the Ames test with *S. typhimurium* TA 98 and TA 100 (remaining AFB₁ removed by t. l. c. prior to mutagenicity testing). Mutagenicity was smaller by at least a factor of 370 with respect to the AFB₁ present before ammoniation. In the ammoniation-product of ^3H -AFB₁ (biosynthetically labelled) the following distribution of

radioactivity was obtained: CH₂Cl₂ (neutral) 49.6%; CH₂Cl₂ (basic) 0.6%; water (basic) 24.7%; diethylether (acidic) 10.1%. The structure of the main product, aflatoxin D₁ (30.7%), was found by ¹H-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 supplemented 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 B₁. *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., Sinnhuber, 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 between 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 M₁ in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and its enhancement 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 B₁ and aflatoxin M₁ 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 B₁ 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 B₁. 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 B₁ 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 carcinogenicity 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