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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 73 (1982)

Heft: 1

Artikel: Übergang von (^{1}C)-Aflatoxin B und Metaboliten in Milch bei der Ratte = Passage of (^{1}C)-aflatoxin B and metabolites into rat milk

Autor: Schroeder, T. / Carden, B.M. / Lüthy, J.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-983439

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. 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. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

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. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

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. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 17.07.2025

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

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **73**, 57—70 (1982)

T. Schroeder, B. M. Carden, J. Lüthy und *Ch. Schlatter,* Institut für Toxikologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule und der Universität Zürich, Schwerzenbach

Übergang von (^{14}C)-Aflatoxin B_1 und Metaboliten in Milch bei der Ratte

Passage of (^{14}C)-Aflatoxin B_1 and Metabolites into Rat Milk

Einleitung

Der Übergang von im Futter vorhandenen Aflatoxinen und deren im Nutztier entstehenden Metaboliten in die Milch ist Anlaß für zahlreiche Untersuchungen gewesen. Aflatoxin M_1 wurde schon früh (1) als wichtigstes, *fluoreszierendes* und toxisches Folgeprodukt von Aflatoxin B_1 in der Milch von Ratten (1), Schafen (2), Ziegen (3), Wasserbüffeln (4) und Kühen (5) erkannt und als 9a-Hydroxy-aflatoxin B_1 identifiziert (6). Verschiedene Autoren (7—14) haben die Menge in der Kuhmilch ausgeschiedenes Aflatoxin M_1 mit der Aufnahme von Aflatoxin B_1 im Futter korreliert. Das gefundene Aflatoxin M_1 entspricht 0,1—3% des aufgenommenen Aflatoxin B_1. Auch mit Hilfe von tritiummarkiertem Aflatoxin B_1 wurde eine Quantifizierung der in die Kuhmilch übergehenden Metaboliten versucht (15). Das gefundene Total aller Ausscheidungen der untersuchten Tiere fällt allerdings mit 15 Prozent in 96 Stunden aus dem Rahmen der bei anderen Spezies gefundenen Werte. Ob dies auf ein tatsächlich anderes Verhalten des Rindes zurückzuführen ist oder ob technische Gründe wie der für austauschmarkiertes Aflatoxin B_1 anderweitig beschriebene Verlust von Tritiumwasser (16) eine Rolle spielen, bleibt unklar. In bezug auf die Bedeutung von Aflatoxin M_1 in der Milch stellen sich die Fragen nach dem Gewicht einzelner freier Metaboliten wie Aflatoxin M_1 in bezug auf den Gesamtgehalt an freien Aflatoxinfolgeprodukten und nach dem Verhältnis letzterer zum makromolekular gebundenen Anteil. Auf beide Fragen kann nur bei Verwendung von markiertem Aflatoxin B_1 eine Antwort gefunden werden, während alle in der Literatur beschriebenen Arbeiten mit einer bereits erwähnten Ausnahme (15) zur Quantifizierung einzig auf die Fluoreszenz des Aflatoxin M_1 abstellten. Da bei fehlender, schwacher oder

durch Begleitsubstanzen unterdrückter Fluoreszenz die Nachweisgrenze ansteigt, kann nur eine minimale, nie aber eine maximal vorhandene Substanzmenge angegeben werden.

Wegen des für Metabolismusuntersuchung an der Milchkuh großen technischen Aufwands entschlossen wir uns, vorerst die Ratte als Modelltier für den Übergang von (^{14}C)-Aflatoxin B_1 in die Milch zu verwenden, obschon eine Übertragung auf die Kuh nicht direkt möglich ist.

Die Metabolisierung von Aflatoxin B_1 durch die Ratte ist mehrfach untersucht worden (17—30). Die 24-Stunden-Ausscheidung bei intraperitonealer Applikation beträgt 70—80%, davon erscheinen ein Viertel im Urin und drei Viertel in den Fäzes (18). Bei oraler Applikation werden als Maximalwert 3,3% der Dosis im Plasma gefunden (25). Es fällt auf, daß im Vergleich zu Aflatoxin B_1 (1%) und Aflatoxicol (0,25%) viel weniger Aflatoxin M_1 (< 0,1%) auftritt. Bei intravenöser Applikation werden höhere Plasmaspiegel von rund 15% erreicht, und Aflatoxicol (4%) ist relativ zu Aflatoxin B_1 (5%) eher noch in größerer Menge gefunden worden, doch auch hier fehlt Aflatoxin M_1 (< 0,2%) fast vollständig. In Perfusionsexperimenten an Rattenlebern (24) wurde als einziger plasmagängiger Metabolit Aflatoxin M_1 gefunden, während in der Galle Aflatoxin B_1, Q_1, eventuell M_1 und zwei weitere Aflatoxinmetaboliten auftraten. In dieser Arbeit wurde allerdings nicht spezifisch nach Aflatoxicol gesucht. Aflatoxicol besitzt wegen seines verschobenen Absorptionsmaximums (33) eine weit schwächere Fluoreszenz als Aflatoxin B_1 oder M_1 bei Anregung mit Licht von 360 nm. Das aus der chemischen Reduktion von Aflatoxin B_1 erhaltene Diastereomerengemisch ist bei der Ratte halb so karzinogen wie die Ausgangssubstanz (31, 32). In der Forelle tritt nur eines der beiden Isomeren auf (33, 34), nämlich jenes mit S-Konfiguration an C-Atom 1 mit der durch Reduktion der Ketogruppe entstandenen Hydroxylfunktion. Aflatoxicol ist somit in seiner Gefährlichkeit ähnlich wie Aflatoxin B_1 und doch etwas kritischer als Aflatoxin M_1. Die Ratte, für welche Aflatoxicol als Hauptmetabolit von Aflatoxin B_1 im Plasma beschrieben worden ist, stellt daher ein speziell interessantes Versuchstier dar. Aufgrund der erwähnten Eigenschaften besteht durchaus die Möglichkeit, daß Aflatoxicol als Aflatoxin-B_1-Metabolit bei früheren Untersuchungen der Erfassung in Milch entgangen sein könnte.

Versuche und Resultate

Gewinnung von Rattenmilch

Die Ratten wurden 4—5 Tage vor dem Melken unter leichter Surital-Narkose um die Zitzen herum rasiert. 5 bis maximal 10 Minuten vor dem Melken musste 1,25 Einheiten synthetisches Oxytocin (Syntocinon, Sandoz) intraperitoneal gespritzt werden, damit die Milchfreigabe erfolgte. Ohne die Oxytocingabe ist die Milchausbeute sehr gering, da die natürliche Oxytocinausschüttung bei Störung der Tiere durch äußere Einflüsse und bei Fehlen des Drüsenreizes unterbleiben kann. Unmittelbar vor dem Melken wurde die Zitze mit K-Y-Gelee (IKS Nr. 14657,

Johnson-Johnson AG, Spreitenbach) bestrichen. Zur Gewinnung der Rattenmilch wurde in Anlehnung an eine in einer pharmazeutischen Firma angewandte Methode ein Melkstand konstruiert, der in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Mittels eines als Zitzenbecher dienenden, aufgeweiteten Polyethylenschlauchs wurde ein Vakuum von 150—200 Torr an die Zitze angelegt und durch ein Magnetventil alle zwei Sekunden von einem Intervallschalter unterbrochen. Eine Spritzennadel gewährleistete die Belüftung des Zitzenbechers bei unterbrochener Vakuumleitung. Durch das abgebogene Schlauchende gelangen pro Melkung und Ratte 0,5—1 ml Milch in das Auffangröhrchen.

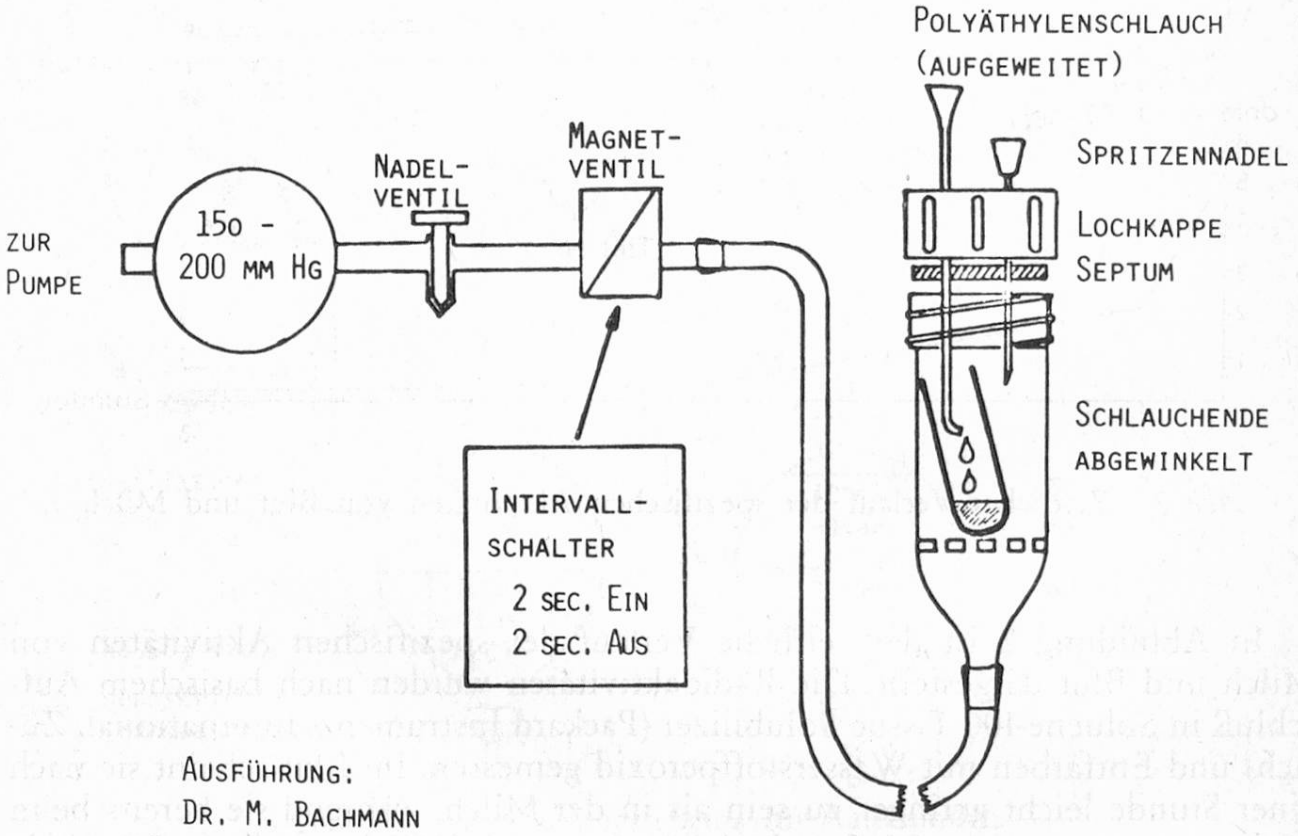

Abb. 1. Rattenmelkapparatur

Spezifische Aktivitäten von Milch und Blut nach Applikation von (^{14}C)-Aflatoxin B_1

Zur Untersuchung des Übergangs der Radiomarkierung von Aflatoxin B_1 in die Milch und der Verteilung auf verschiedene Metaboliten wurde biosynthetisch nach *Hsieh* und *Mateles* (37) hergestelltes Aflatoxin B_1 in neunprozentiger Ethanollösung mit der Schlundsonde an zwei laktierende Ivanovas Sprague-Dawley-Ratten appliziert. Tier 1 erhielt 1,54 μCi (14,8 μg) eine Woche nach dem Werfen, Tier 2 1,94 μCi (18,7 μg) nach der zweiten Laktationswoche. Das erste Tier wurde 1, 4, 24 und 48 Stunden nach der Applikation gemolken, das zweite nach 2, 5, 24 und 48 Stunden. Nach dem Melken wurden die Muttertiere zwecks Erhaltung der Milchproduktion zu den Jungen zurückgegeben und eine Stunde vor der

nächsten Melkung wieder entfernt. Blut aus der Schwanzvene konnte aus technischen Gründen nur von Tier 2 gewonnen werden.

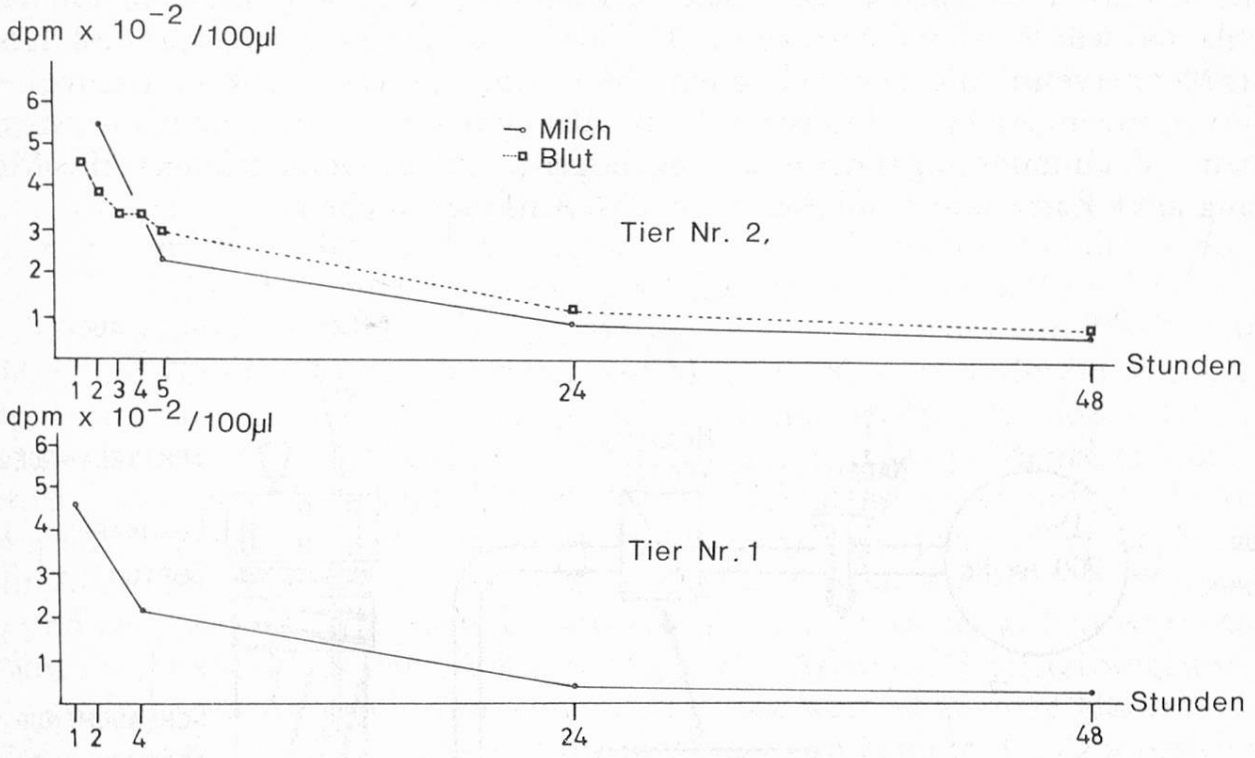

Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivitäten von Blut und Milch

In Abbildung 2 ist der zeitliche Verlauf der spezifischen Aktivitäten von Milch und Blut dargestellt. Die Radioaktivitäten wurden nach basischem Aufschluß in Soluene-100 Tissue Solubilizer (Packard Instruments International, Zürich) und Entfärben mit Wasserstoffperoxid gemessen. Im Blut scheint sie nach einer Stunde leicht geringer zu sein als in der Milch, während sie bereits beim nächsten gemeinsamen Meßpunkt leicht über dem Milchwert liegt. Für beide Kompartimente sind auffallend ähnliche volumenbezogene spezifische Aktivitäten festzustellen und der zeitliche Verlauf ist beinahe parallel. Die Milchkurven beider Tiere zeigen gute Übereinstimmung.

Verteilung der Radiomarkierung auf verschiedene Fraktionen

Zur Quantifizierung des proteingebundenen Anteils und einzelner Aflatoxinmetaboliten wurde die Milch nach der in Abbildung 3 gezeigten Methode aufgearbeitet. Nach Zumischen einer Lösung der inaktiven Aflatoxine B_1, M_1, B_{2a} und Aflatoxicol in zehnprozentigem Ethanol wurde die Milchprobe bei 4 °C über Nacht stehen gelassen, um eventuell reversibel in Proteinkomplexen gebundene Metaboliten herauszuverdünnen. Bei dieser Ethanolkonzentration trat kei-

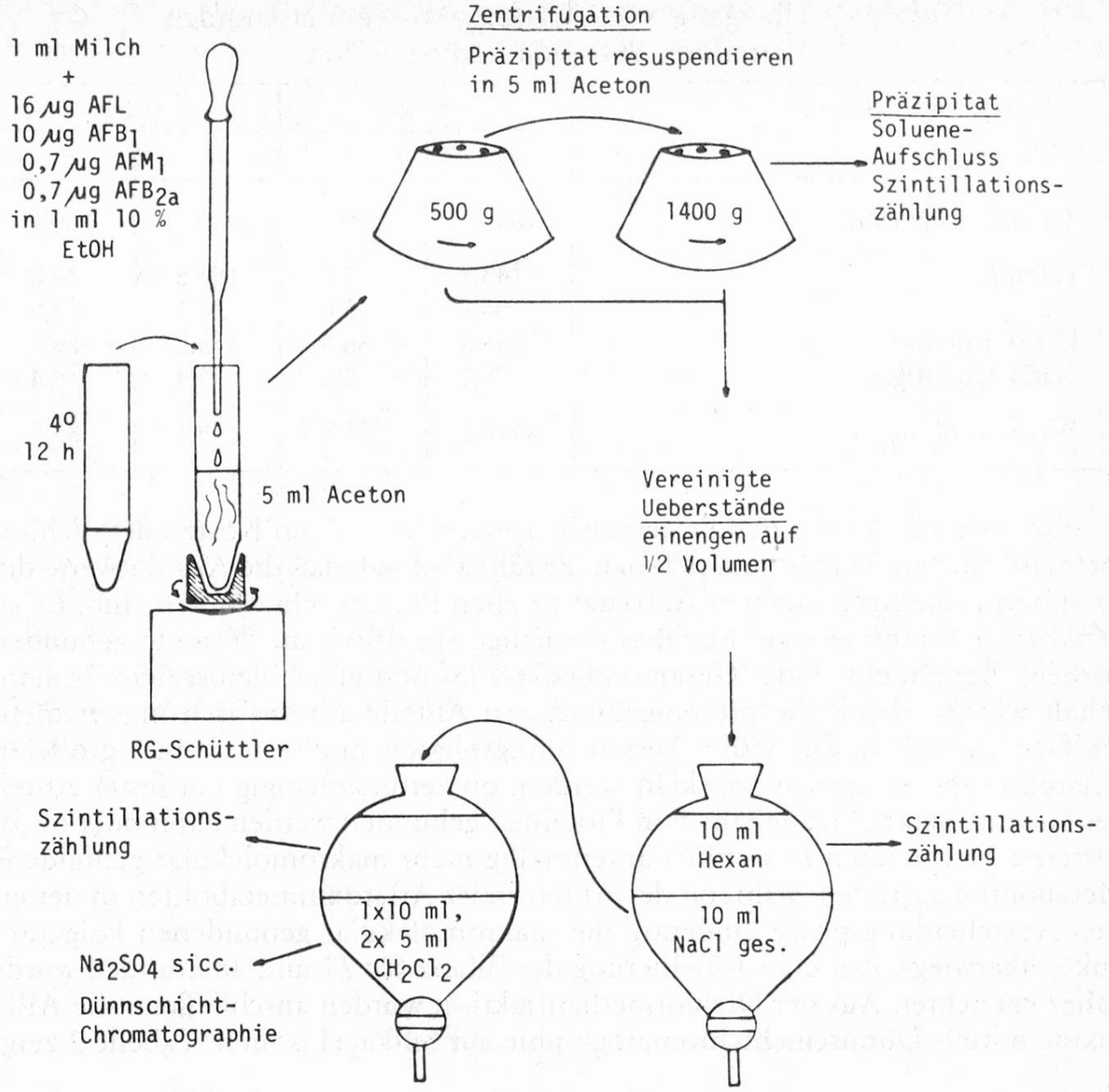

Abb. 3. Aufarbeitungsschema für Rattenmilch

ne ersichtliche Proteinfällung auf. Diese wurde anschließend durch Einrühren in Aceton herbeigeführt. Nach einer ersten Zentrifugation wurde das Proteinsediment mit frischem Aceton einmal gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Extrakt wurde nach Abblasen von Aceton im Stickstoffstrom zwischen je 10 Milliliter gesättigte Kochsalzlösung und Hexan verteilt, worauf die entfettete wässerige Phase mit Dichlormethan ausgezogen wurde. Für die nach einer und nach vier Stunden gewonnene Milch von Tier 1 sind die in den verschiedenen Fraktionen vorgefundenen Radioaktivitäten in Tabelle 1 zusammengefasst. Auf die Aufarbeitung der Milch von Tier 2 wurde aus technischen Gründen verzichtet. Zu beiden Zeitpunkten ist nur eine geringe Aktivität in der Hexanfraktion auffindbar, während der Hauptteil im Dichlormethan vorliegt. Die in der Kochsalzlösung vorgefundenen Anteile bleiben ungefähr gleich und sind ebenfalls gering. Nach vier

Tabelle 1. Übergang von Aflatoxin B_1 in Rattenmilch
Verteilung der (^{14}C)-Radioaktivität

Zeit nach oraler Applikation	1 Stunde		4 Stunden	
	dpm	%	dpm	%
Totalaktivität Milch	3635	100	979	100
Fällung	143,4	3,8	183,8	18,8
Hexan	108,6	3,0	28,1	2,9
Dichlormethan	3159,2	86,9	573,8	58,6
NaCl (gesättigt)	79,1	2,2	33,4	3,4
Wiederfindung	3490,3	95,9	819,1	83,7

Stunden scheint der mit den Proteinen ausgefällte Anteil auf Kosten des dichlormethanlöslichen Anteils zuzunehmen. Es fällt aber auf, daß die Absolutwerte der gesamten proteingebundenen Aktivität in allen Proben sehr ähnlich sind. Es ist denkbar, daß eine gewisse Metabolitenmenge spezifisch an Proteine gebunden vorliegt. Bei abnehmender Gesamtradioaktivität und gleichbleibendem Proteingehalt würden damit die proteingebundenen Anteile automatisch immer mehr ins Gewicht fallen. Für späte Ausscheidungsphasen müßte mit einer größeren Aflatoxingabe zusätzlich abgeklärt werden, ob zeitunabhängig ein fester Anteil des Gesamtmetabolitengehalts von Proteinen gebunden werden kann oder ob zu späteren Zeitpunkten tatsächlich anteilmäßig mehr makromolekular gebundene Metaboliten auftreten, während der Anteil freier Aflatoxinmetaboliten in der ersten Ausscheidungsphase eindeutig die makromolekular gebundenen Folgeprodukte überwiegt. Auf eine Tabellierung der Bilanz für 24 und 48 Stunden wurde daher verzichtet. Aus der Dichlormethanfraktion wurden anschließend die Aflatoxine mittels Dünnschichtchromatographie auf Silikagel isoliert. Tabelle 2 zeigt

Tabelle 2. Erstes Radio-Dünnschichtchromatogramm der dichlormethanlöslichen (^{14}C)-AFB_1-Metaboliten aus Rattenmilch

Zeit nach Applikation	1 Stunde		4 Stunden	
	dpm	%	dpm	%
Total aufgetragen	3032,2	100	551,3	100
Aflatoxicol	46,5	1,5	N.D.	0,2
Aflatoxin B_1	180,1	5,95	19,4	3,5
Aflatoxin M_1	2043,8	67,4	378,5	68,7
Aflatoxin B_{2a}	85,0	2,8	—	—
Auftragestelle	94,0	3,1	55,5	10,1
Wiederfindung	2473,3	80,75	453,4	82,2

die Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Metaboliten im ersten Dünnschichtchromatogramm für die nach einer und nach vier Stunden erhaltene Milch. Die Silikagelplatte (Merck Nr. 5737) wurde aufeinanderfolgend zweimal mit Chloroform-Tetrahydrofuran 9 : 1 und einmal mit Ethylacetat-Aceton-Isopropanol-Wasser 100 : 20 : 6,4 : 0,8 entwickelt. Die bei Bestrahlung mit Licht von 360 nm deutlich sichtbaren, fluoreszierenden Zonen wurden ausgekratzt und zur Desorption in Dichlormethan-Ethanol 2 : 1 eingerührt. Nach dem Filtrieren wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom eingedampft und durch Dichlormethan ersetzt.

Aflatoxin M_1 stellt mit einem Anteil von beinahe 70% tatsächlich den wichtigsten Metaboliten von Aflatoxin B_1 in der Rattenmilch dar. Die Anwesenheit von mehr als 1,5% Aflatoxicol konnte mit Sicherheit ausgeschlossen werden, obschon dieses wie bereits erwähnt im Plasma als Hauptmetabolit vorliegen soll. Aflatoxin B_1, welches nach *Wong* und *Hsieh* (25) eine Stunde nach oraler Aufnahme etwa 30% der Plasmaaktivität umfasst, wurde nach einer Stunde zu 5% und nach vier Stunden zu 3,5% bezüglich der ganzen Milchaktivität ebenfalls in der Milch vorgefunden. Aflatoxin B_{2a} umfaßte 1,5% und könnte teilweise auch beim Auftragen auf die Silikagelplatte entstanden sein aus Aflatoxin B_1. Wie auch aus der graphischen Darstellung des Radiodünnschichtschromatogramms (Abb. 4) ersichtlich ist, befindet sich zwischen den beiden apolaren Zonen keine nennenswerte (< 0,15%) Radioaktivität. Zwischen den beiden polaren Aflatoxi-

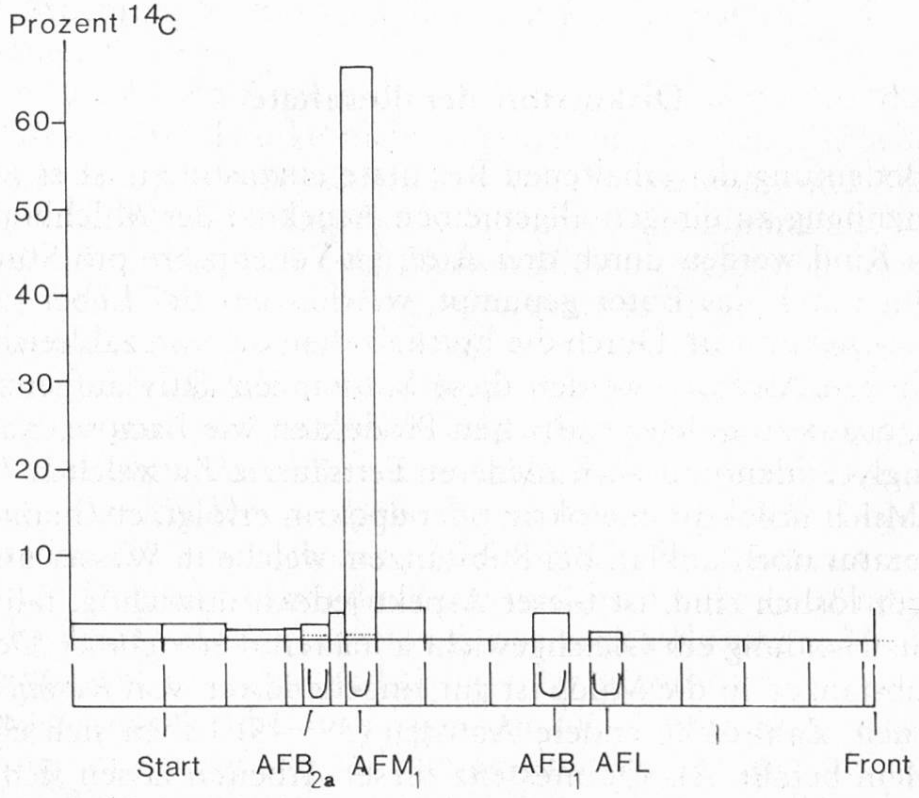

Abb. 4. Radiodünnschichtchtomatogramm der dichlormethanlöslichen Anteile (Silikagel, Laufmittel: Chloroform-Tetrahydrofuran 9 : 1; erste Entwicklung. Ethylacetat-Aceton-Isopropanol-Wasser 100 : 20 : 6,4 : 0,8; zweite und dritte Entwicklung)

nen M_1 und B_{2a} wurden dagegen 5,6% der auf das Dünnschichtchromatogramm gelangten Aktivität ermittelt. Durch Rechromatographie der desorbierten Isolate konnte deren radiochemische Reinheit bestimmt werden, allerdings wegen der verfügbaren Radioaktivität nur für die nach einer Stunde gewonnene Milch. Die Resultate sind in Tabelle 3 aufgeführt, aus der ebenfalls die verwendeten DC-Systeme entnommen werden können. Die Werte für Aflatoxin B_1 und M_1 konnten

Tabelle 3. Rechromatographie der DC-Zonen

Zone	AFL	AFB_1	AFM_1	AFB_{2a}	Start	System
AFL	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	9,5%	I
AFB_1	N. D.	81,3%	1,8%	N. D.	17,2%	I
AFM_1	N. D.	N. D.	93,6%	2,3%	2,6%	II
AFB_{2a}	N. D.	N. D.	34,7%	29,7%	35,0%	II

Laufmittelsysteme: I Ethylacetat-Chloroform (3 : 1)
II Ethylacetat-Aceton-Isopropanol-Wasser (100 : 20 : 6,4 : 0,8)

weitgehend bestätigt werden, während Aflatoxin B_{2a} eine starke Verunreinigung durch den Hauptmetaboliten aufwies. Die in der Aflatoxicolzone gefundenen 46,5 dpm ergaben nur am Auftragsort eine über dem Hintergrund liegende Aktivität und können somit nicht dem inaktiv in ausreichender Menge vorhandenen Aflatoxicol zugeschrieben werden.

Diskussion der Resultate

Um die Bedeutung der erhaltenen Resultate einzustufen, ist es zweckmäßig, den Zusammenhang zu einigen allgemeinen Aspekten der Milchbildung herzustellen. Beim Rind werden durch drei Arterien-Venenpaare pro Stunde 300 bis 500 Liter Blut durch das Euter gepumpt, welches aus der Leber via Herz die Milchbausteine heranführt. Durch die Epithelzellen der von zahlreichen Kapillaren umsponnenen Alveolen werden diese Substanzen aktiv aufgenommen und teilweise umgebaut zu milchspezifischen Produkten wie Lactose, Kasein, α-Lactalbumin, Triglyceriden und auch niederen Fettsäuren. Zu welchen Anteilen die Abgabe der Milch holokrin, merokrin oder apokrin erfolgt, erscheint bei Durchsicht der Literatur noch unklar. Bei Substanzen, welche in Wasser und Membranen relativ gut löslich sind, ist dieser Aspekt jedoch unwichtig, falls zum Zeitpunkt der Ausscheidung ein Gleichgewicht annähernd erreicht ist. Der Übergang von Fremdsubstanzen in die Milch ist am eingehendsten von *Rasmussen* (38) untersucht worden. Zahlreiche andere Autoren (39—45) haben sich ebenfalls mit diesem Problem befaßt. Als Quintessenz dieser Arbeiten lassen sich die folgenden Aussagen machen:

1. Ionen mit Molekulargewicht grösser als 200 gehen nur durch aktiven Transport in die Milch über. Der ionisierte Anteil von ionisierbaren Substanzen kann

bei Abwesenheit eines Transportsystems die Plasmamilchschranke nicht passieren. Aktiver Transport ist nur für wenige Substanzen wie Aminopyrin, N_4-acetyl-p-aminohippursäure und N_4-acetyl-sulphanilamid (45) beschrieben.

2. Nicht ionisierbare Substanzen wie Harnstoff, Ethanol und Chloramphenicol treten *passiv* durch *Diffusion* vom Blut in die Milch oder umgekehrt von der Milch ins Blut über und erreichen bei Gleichgewicht gleiche Konzentrationen in Plasma und Milch. Fettlösliche Substanzen diffundieren durch die Lipidschichten, wasserlösliche durch wassergefüllte Poren. Die obere Auschlußgrenze dürfte aufgrund von Experimenten mit Polyethylenglykolen bei ungefähr 4000 Dalton liegen.

3. Das Konzentrationsverhältnis Milch zu Plasma läßt sich für partiell ionisierte Substanzen nach Erreichen des Gleichgewichtes aus deren pK_s-Wert und den pH-Werten der beiden Kompartimente voraussagen, da nur die nicht ionisierten Anteile durch die Plasma-Milchschranke durchtreten können. Da die Milch im allgemeinen saurer ist als das Blut, treten Basen in der Milch in größerer, Säuren dagegen in kleinerer Gesamtkonzentration auf als im Blut — die Konzentrationen der ungeladenen Anteile sind aber in Blut und Milch gleich. Am besten untersucht ist die Klasse der Sulfonamide. Tetracycline mit ihren nahe zusammen liegenden pK_s-Werten zeigen ein von diesem einfachen Diffusionsmodell abweichendes Verhalten.

4. Der Verteilungskoeffizient einer Substanz zwischen wässeriger und Lipidphase bestimmt die Kinetik des Blut-Milch-Übertritts und die Konzentration der Substanz im Milchfett. Schlecht lipidlösliche Substanzen diffundieren im allgemeinen lagsamer.

Trotz einer stattlichen Anzahl untersuchter Substanzen kann der Durchtritt durch die Plasmamilchschranke nicht vorausgesagt werden. Bei jedem Versuch darf nicht außer acht gelassen werden, daß Metabolisierungs- und Absorptionskinetik auf der einen Seite, die Durchtrittskinetik an der Plasmamilchschranke auf der anderen die Resultate stark beeinflussen können, wenn nicht durch spezielle Vorkehrungen bei der Applikation ein Gleichgewichtszustand angenähert wird.

Für die neutralen, in Wasser wie auch in organischen Lösungsmitteln löslichen Aflatoxine ist bei Gleichgewicht die gleiche Konzentration in beiden Kompartimenten zu erwarten. Tatsächlich sind die erhaltenen volumenbezogenen spezifischen Radioaktivitäten über den ganzen beobachteten Zeitraum in Blut und Milch sehr ähnlich. Der weitgehend parallele, leicht tiefer liegende Verlauf der Milchaktivität im Vergleich zur Blutaktivität (Tier 2) scheint zu bestätigen, daß kein aktiver Transport durch die Plasmamilchschranke stattfindet. Die Überschneidung der beiden als Zeitfunktion gezeichneten Kurven (Abb. 2) in der frühen Ausscheidungsphase ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß sich an der Plasmamilchschranke das Gleichgewicht nicht vollständig einstellen kann und demzufolge die maximale Milchkonzentration der Metaboliten erst nach der maximalen Blutkonzentration durchlaufen wird. Ebenfalls aufgrund derselben Voraussetzung müßte man aus dem gefundenen Metabolitenmuster den Schluß ziehen, Aflatoxin M_1 sei der Plasmahauptmetabolit von Aflatoxin B_1, Aflatoxicol dagegen fehle. Diese offensichtliche Diskrepanz zu der Arbeit von

Wong und *Hsieh* ist nicht ohne weiteres erklärbar. Stammunterschiede im Aflatoxinmetabolismus scheinen aufgrund einer weiteren Untersuchung durch die gleichen Autoren (27) als Ursache eher unwahrscheinlich, da in drei verschiedenen Stämmen Aflatoxicol gefunden wurde. *Wong* und *Hsieh* gewannen ihr Blut aus der vena iugularis, welche im Vergleich zur Milchdrüse ausgehend von der Leber zu einem späteren Zeitpunkt durchlaufen wird. Aflatoxicol wird zumindest in einigen Species im Gegensatz zu Aflatoxin M_1 und anderen Metaboliten nicht im als Mikrosomen sedimentierbaren endoplasmatischen Reticulum, sondern durch lösliche Enzyme im 105 000 g Überstand gebildet (46, 47). Es besteht die Möglichkeit, daß es nach dem Passieren der Milchdrüse gebildet und in der Leber zu Aflatoxin B_1 reoxidiert wird. Eine neuere Arbeit (48) zeigt, daß Aflatoxicol tatsächlich in der Ratte in vivo und durch isolierte Primärhepatozyten zu Aflatoxin B_1 reoxidiert werden kann.

Offen ist auch die Frage der Übertragbarkeit der im Rattenversuch erhaltenen Resultate auf das Rind. Sicher ist eine direkte Übertragung nicht möglich, da das Rind als Wiederkäuer nicht zuletzt durch die andere Bakterienflora und die längere Verweildauer im Pansen (47) ein anderes Absorptionsverhalten und zusätzlich eine andere Lebermetabolisierungsrate zeigen dürfte. Der eigentliche Laktationsvorgang ist jedoch bei vielen Säugern ähnlich, so daß grundsätzlich andere Verhältnisse an der Plasmamilchschranke nicht zu erwarten sind. Es ist in diesem Zusammenhang interessant, daß in Kuhmilch ebenfalls Aflatoxin B_1 gefunden wurde (10, 12), wenn auch in geringerer Menge als in der Rattenmilch des vorliegenden Versuchs und nur bei sehr hoher Dosierung.

Es scheint daher aufgrund unserer Resultate nicht abwegig, an der Ratte mit entsprechend geringem Aufwand Aussagen über *mögliches* Auftreten von im Plasma *vorhandenen* Metaboliten in der Kuhmilch zu gewinnen. Das verwendete Tiermodell sollte indessen durch parallele Untersuchung der an relevanter Stelle gewonnenen Blutmetaboliten sowie durch einige Parallelversuche in Ratte und Kuh breiter abgestützt werden, um so mehr als sich in jüngster Zeit Hinweise für die Anwesenheit von Aflatoxicol in Kuhmilch ergaben (49). Dadurch würde zusätzlich zur Absicherung des Durchtrittmusters auch die Durchtrittskinetik an der Plasmamilchschranke erfaßbar. Auch ohne diese auf pharmakologischen Überlegungen basierenden Verbesserungen beantwortet aber dieser einfache Versuch die beiden gestellten Fragen nach makromolekular gebundenem Metabolitenanteil und nach freiem Aflatoxicol hinreichend.

Dank

Herrn *M. Lemaire,* Sandoz AG, Basel, und Herrn Dr. *M. Bachmann,* Institut für Toxikologie ETH und Universität Zürich, Schwerzenbach, sei herzlich gedankt für wertvolle Hinweise zur Rattenmelkmethode bzw. für die zur Verfügung gestellte Melkapparatur. Weiterer Dank gebührt Herrn Dr. *M. Schällibaum,* Eidg. Versuchsanstalt, Liebefeld, für zahlreiche Anregungen in bezug auf den Übergang von niedermolekularen Substanzen in die Milch.

Zusammenfassung

Biosynthetisch hergestelltes (^{14}C)-Aflatoxin B_1 wurde oral an zwei laktierende Sprague-Dawley-Ratten verabreicht. Die spezifischen Aktivitäten von Milch und Blut nahmen von rund 5000 dpm/ml (1 h) und rund 2000 dpm/ml (4 h) auf rund 1000 dpm/ml nach 24 Stunden ab. Die mit Aceton gefällten Makromoleküle sowie die Wasser-, die Hexan- und die Dichlormethanfraktion enthielten 3,8%, 2,2%, 3,0% bzw. 86,9% der Milchaktivität nach 1 h und 18,8%, 3,4 %, 2,9% bzw. 58,6% nach 4 h. Mit Isotopenverdünnung und DC wurden 4 Aflatoxine isoliert. Aflatoxin M_1 umfaßte mit 67,4% (1 h) und 68,4% (4 h) die Hauptaktivität der Dichlormethanfraktion, Aflatoxin B_1 5,95% (1 h) und 3,5% (4 h). Die nach Rechromatographie in Aflatoxin B_{2a} gemessene Radioaktivität entsprach 0,8%, während Aflatoxicol keine Aktivität enthielt. Das Metabolitenmuster in Rattenmilch ist vereinbar mit den von *Unger* et al. (1977) für Plasma aus perfundierten Lebern beobachteten und widerspricht dem von *Wong* und *Hsieh* (1978) beschriebenen. Reoxidation des vorhandenen Aflatoxicols in der Leber könnte das völlige Fehlen in der Rattenmilch erklären.

Résumé

De l'aflatoxine B_1 marquée au ^{14}C par biosynthèse fut appliquée per os à deux rats en lactation. Les activités spécifiques du lait et du sang ont diminué d'à peu près 5000 dpm/ml (1 h) et 2000 dpm/ml (4 h) jusqu'à une valeur de 1000 dpm/ml àpres 24 h. La partie macromoléculaire précipitée à l'acétone contenait 3,8% (1 h) et 18,8% (4 h), la fraction aqueuse 2,2% (1 h) et 3,4% (4 h), l'extrait à l'hexane 3% (1 h) et 2,9% (4 h) et l'extrait au dichlorométhane 86,9% (1 h) et 58,6% (4 h). Quatre aflatoxines furent isolées par CCM de l'extrait au dichlorométhane. La zone attribuée à l'aflatoxine M_1 contenait 67,4% (1 h) et 68,4% (4 h) de l'activité dans le dichlorométhane, celle de l'aflatoxine B_1 5,95% (1 h) et 3,5% (4 h). L'aflatoxine B_{2a} contenait 0,8% après une deuxième chromatographie et l'aflatoxicol ne contenait plus aucune radioactivié. Le métabolisme de l'aflatoxine B_1 trouvée dans le lait est comparable à celui décrit par *Unger* et al. (1977) pour le plasma obtenu dans la perfusion d'un foie, mais il est contradictoire à celui proposé par *Wong* et *Hsieh* (1978). Une réoxidation hépatique de l'aflatoxicol pourrait être la raison de l'absence de ce métabolite dans le lait du rat.

Summary

Two lactating rats were orally administered biosynthetically labelled (^{14}C)-aflatoxin B_1. The specific activities of blood and milk decreased from 5000 dpm/ml (1 h, 2 h) and 2000 dpm/ml (4 h, 5 h) to 1000 dpm/ml at the end of 24 h. The radioactivity found after work-up of milk in the acetone-precipitated macromolecular fraction, the aqueous phase, the hexane and dichloromethane extracts amounted to 3.8%, 2.2%, 3.0% and 86.9%, respectively, after 1 h and 18.8%, 3.4%, 2.9% and 58.6%, respectively, after 4 h. Four aflatoxins were isolated from the dichloromethane-extract by isotope dilution and TLC. Of the total activities in dichloromethane, 67.4% (1 h) and 68.4% (4 h) were desorbed with aflatoxin M_1, 5.95% (1 h) and 3.5% (4 h) with aflatoxin B_1. The radioactivity present in AFB_{2a} after rechromatography corresponded to 0.8%, while aflatoxicol contained no radioactivity. The metabolite pattern found in rat milk is in agreement with that obtained by *Unger* et al. (1977) in plasma of a

perfused liver, but is contradictory to the finding of aflatoxicol by *Wong* and *Hsieh* (1978). Hepatic reoxidation of aflatoxicol could possibly explain the absence of aflatoxicol in rat milk.

Literatur

1. *de Iongh, H., Vlex, R. O.* and *van Pelt, J. G.:* Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet. Nature 202, 466–467 (1964).
2. *Nabney, J., Burbage, M. B., Allcroft, R.* and *Gwyneth, L.:* Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion pattern in the lactating ewe. Fd. Cosmet. Toxicol. **5**, 11–17 (1967).
3. *Juszkiewicz, T., Piskorska-Pliszcynska, J.* and *Cybulski, W.:* Aflatoxins in milk and tissues: Experiments on rabbits and goats. Zesz. Probl. Postepow Nauk Roln. **189**, 41–45 (1977).
4. *Yadagiri, B.* and *Tulpule, P. G.:* Aflatoxin in buffalo milk. Indian J. Dairy Sci. **27**, 293–297 (1974).
5. *Van der Linde, J. A., Frens, A. M.* and *van Esch, G. J.:* Experiments with cows fed groundnut meal containing aflatoxin. Mycotoxins Foodstuffs, Proc. Symp. Mass. Inst. Technol. 247–249 (1964).
6. *Holzapfel, C. M., Steyn P. S.* and *Purchase, I. F. H.:* Isolation and structure of aflatoxins M_1 and M_2. Tetrahedron Letters **25**, 2799–2803 (1966).
7. *Allcroft, R. Roberts, B. A.* and *Lloyd, M. K.:* Excretion of aflatoxin in a lactating cow. Fd. Cosmet. Toxicol. **6**, 619–625 (1968).
8. *Masri, M. S. Garcia, V. C.* and *Page, J. R.:* The aflatoxin content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin. Vet. Rec. **84**, 146–147 (1969).
9. *Hoversland, A. S., McKinney, J., Selkirk, R., Cavanagh, G., Pearson, J.* and *Nelson, D. M.:* Aflatoxin studies with lactating and non-lactating dairy cows. J. Animal Sci. **37**, 253–254 (1973).
10. *Kiermeier, F.:* Aflatoxin M_1 excretion in cow's milk depending on the quantity of aflatoxin B_1 ingested. Milchwissenschaft **28**, 683–685 (1973).
11. *Lafont, P.* and *Lafont, J.:* Aflatoxin elimination by cows. Cah. Nutr. Diet. **10**, 55–57 (1975).
12. *Pisak, A., Zapletal, O., Jagos, P., Dvorak, R.* and *Bouda, J.:* Aflatoxin excretion with the milk of dairy cows with experimentally induced aflatoxicosis. Vet. Med. (Prag) **23**, 219–224 (1978).
13. *Shreeve, B. J., Patterson, D. S. P.* and *Roberts, B. A.:* The carry-over of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. Fd. Cosmet. Toxicol. **17**, 151–152 (1979).
14. *Sieber, R.* und *Blanc, B.:* Zur Ausscheidung von Aflatoxin M_1 in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten – eine Literaturübersicht. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **69**, 477–491 (1978).
15. *Polan, C. E., Hayes, J. R.* and *Campbell, C. T.:* Consumption and fate of aflatoxin B_1 by lactating cows. J. Agric. Food Chem. **22**, 635–638 (1974).
16. *Jaggi, W.:* Die kovalente Bindung von Östrogenen und Aflatoxinderivaten an DNS; ein Beitrag zur Untersuchung von schwachen chemischen Karzinogenen. Dissertation Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Nr. 6455 (1979).
17. *Butler, W. H.* and *Clifford, J. I.:* Extraction of aflatoxin from rat liver. Nature **206**, 1045–1046 (1965).
18. *Wogan, G. N., Edwards, G. S.* and *Shank, R. C.:* Excretion and tissue destribution of radioactivity from aflatoxin B_1-^{14}C in rats. Cancer Res. **27**, 1729–1736 (1967).

19. *Purchase, I. F. H.* and *Steyn, M.:* The Metabolism of aflatoxin B_1 in rats. Brit. J. Cancer **23**, 800—805 (1969).
20. *Dann, R. E.:* In vivo metabolism of carbon-14-labeled aflatoxins B_1, B_2 and G_1 in rats. Diss. Ohio State Univ. Columbus, Ohio 1970, Diss. abstr. Int. B **32**(1), 461—462 (1971).
21. *Steyn, M., Pitout, M. J.* and *Purchase, I. F. H.:* A comparative study on aflatoxin B_1 metabolism in mice and rats. Brit. J. Cancer **25**, 291—297 (1971).
22. *Dann, R. E., Mitscher, L. A.* and *Couri, D.:* The in vivo metabolism of ^{14}C-labeled aflatoxins B_1, B_2, G_1 in rats. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. **3**, 667—675 (1972).
23. *Drahms, R.* and *Gurtoo, H. L.:* Metabolism of aflatoxin B_1 to Q_1, M_1 and P_1 by mouse and rat. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. **15**, 11—20 (1976).
24. *Unger, P. D., Mehendale, H. M.* and *Hayes, W.:* Hepatic uptake and disposition of aflatoxin B_1 in isolated perfused rat liver. Toxicol. Appl. Pharmacol. **41**, 523—534 (1977).
25. *Wong, Z. A.* and *Hsieh, D. P. H.:* Aflatoxicol: Major metabolite in rat plasma. Science **200**, 325—327 (1978).
26. *Hsieh, D. P. H.:* Comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B_1: An overview. Toxicol. Appl. Pharmacol. **45**, 272 (1978).
27. *Wong, J. J.* and *Hsieh, D. P. H.:* Strain dependent toxicokinetics of aflatoxin B_1 in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. **45**, 273 (1978).
28. *Decad, G. M., Dougherty, K. K., Hsieh, D. P. H.* and *Byard, J. L.:* Comparative metabolism of aflatoxin B_1 in mouse and rat primary hepatocyte cultures. Toxicol. Appl. Pharmacol. **45**, 274 (1978).
29. *Wey, C. I., Decad, G. M., Wong, Z. A., Byard, J. L.* and *Hsieh, D. P. H.:* Characterization and mutagenicity of water-soluble conjugates of aflatoxin B_1. Toxicol. Appl. Pharmacol. **45**, 274 (1978).
30. *Wong, Z. A., Rice, D. W.* and *Hsieh D. P. H.:* Comparative toxicokinetics of AFB_1 in the Rhesus monkey, rat and mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol. **45**, 275 (1978),
31. *Nixon, J. E., Hendricks, J. D., Pawlowski, N. E., Loveland, P. M.* and *Sinnhuber, R. O.:* Carcinogenicity of aflatoxicol in Fischer 344 rats. J. Natl. Cancer. Inst. **66**, 1159—1163 (1981)
32. *Schoenhard, G. L., Hendricks, J. D.* and *Nixon, J. E.:* Aflatoxicol-induced carcinoma in rainbow trout (Salmo gairdneri) and the effect of cyclopropenoid fatty acids. Cancer Res. **41**, 1011—1014 (1981).
33. *Schoenhard, G. L., Lee, D. J., Howell, S. E., Pawlowski, N. E., Libbey, L. M.* and *Sinnhuber, R. O.:* Aflatoxin B_1 metabolism to aflatoxicol and derivatives lethal to Bacillus subtilis GSY 1057 by rainbow trout (Salmo gairdneri) liver. Cancer Res. **36**, 2040—2045 (1976).
34. *Newton, G. M., Pantaleo, N. S., Churchill, F.* and *Cox, R. H.:* Stereo-chemistry of aflatoxicol B. J. Agric. Food Chem. **27**, 1339—1341 (1979).
35. *Wogan, G. N.* and *Paglialunga, S.:* Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M_1 in rats. Fd. Cosmet. Toxicol. **12**, 381—384 (1974).
36. *Canton, J. H., Kroes, R., van Logten, M. J., von Schothorst, M., Stavenutter, J. F. C.* and *Verhülsdonk, C. A. H.:* The carcinogenicity of aflatoxin M_1 in rainbow trout. Fd. Cosmet. Toxicol. **13**, 441—443 (1975).
37. *Hsieh, D. P. H.* and *Mateles, R. I.:* Preparation of labeled aflatoxins with high specific activities. Appl. Microbiol. **22**, 79—83 (1971).
38. *Rasmussen, F.:* Studies on the mammary excretion and absorption of drugs. Carl F. Mortensen publ., Kopenhagen 1966.
39. *Ziv, G.:* Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy. Vet. Med. — Small anim. clinician (2), 277—290; (3), 469—474; (4), 657—670 (1978).

40. *Ziv, G.* and *Sulman, F. G.:* Analysis of pharmacokinetic properties of nine tetracycline analogues in dairy cows and ewes. Am J. Vet. Res. **35**, 1197–1201 (1974).
41. *Knowles, J. A.:* Excretion of drugs in milk – a review. J. Pediatrics **66**, 1068–1082 (1965).
42. *Sisodia, C. S.* and *Stowe, G. M.:* The mechanism of drug secretion into bovine milk. Ann. New York Acad. Sci. **111**, 651–661 (1977).
43. *Estergreen, V. L., Lin, M. T., Martin, E. L., Moss, G. E., Branen, A. L., Luedecke, L. O.* and *Shimoda, W.:* Distribution of Progesterone and its metabolites in cattle tissues following administration of progesterone-4-^{14}C. J. Anim. Sci. **46**, 642–651 (1977).
44. *Purdy, R. H., Durocher, C. K., Moore, P. H., Jr.* and *Rao, N. P.:* Analysis of metabolites of progesterone in bovine liver, kidney fat and milk by high performance liquid chromatography. J. Steroid Biochem. **14**, 1307–1315 (1980).
45. *Wilson, J. T., Brown, R. D., Cherek, D. R., Dailey, J. W., Hilman, B., Jobe, P. C., Manno, B. R., Redetzki, H. M.* and *Stewart, J. J.:* Drug excretion in human breast milk. Clin. Pharmacokinetics **5**, 1–66 (1980).
46. *Patterson, D. S. P.* and *Roberts, B. A.:* In vitro reduction of aflatoxins B_1 and B_2 by soluble avian liver enzymes. Fd. Cosmet. Toxicol. **9**, 829–837 (1971).
47. *Engel, G.* und *Hagemeister, H.:* Untersuchungen über den Verbleib von Aflatoxin B_1 im Verdauungstrakt von Kühen. Milchwissenschaft **33**, 21–23 (1978).
48. *Wong, Z. A., Decad. G. M., Byard, J. L.* and *Hsieh, D. P. H.:* Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B_1 in rats in vivo and in primary hepatocyte culture. Fd. Cosmet. Toxicol. **17**, 481–486 (1979).
49. *Trucksess, M. W.* and *Stoloff, L.:* High performance liquid chromatographic determination of aflatoxicol in milk, blood and liver. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **64**, 1083–1087 (1981).

Dr. Theodor Schroeder
Kant. Laboratorium
Kannenfeldstraße 2
Postfach
CH-4012 Basel

Dr. J. Lüthy
Prof. Dr. Ch. Schlatter
Institut für Toxikologie der
ETH und der Universität Zürich
Schorenstraße 16
CH-8603 Schwerzenbach

P. P. Schmid, J. Lüthy, H. P. Pfirter, H. U. Halter, H. Horber und *H. Jucker,* Institut für Toxikologie der ETH und der Universität Zürich, Schwerzenbach

Zur Verwendung von Rapsschrot in der Tiermast: Analytik und Toxikologie einiger Rapsinhaltsstoffe

Dieser Kurzvortrag wird in einem nächsten Heft publiziert.

M. R. Besson, Nestlé, La Tour-de-Peilz

Dosage du phosphore par absorption atomique

Le manuscrit de cette communication ne nous a pas été adressé.