

Wir haben nun versucht, mit Hilfe papierchromatographischer Methoden einen Überblick über die in der Frauenmilch vorkommenden Zucker zu gewinnen, wobei wir unsere Untersuchungen auf Kuhmilch und Rattenmilch ausgedehnt haben. Bei der Untersuchung von Frauen- und Kuhmilch machte sich dabei der im Vergleich zu den Begleitzuckern sehr hohe Laktosegehalt der Milch störend bemerkbar, so dass benachbarte Zucker mit nur wenig niedrigeren R_f -Werten nicht erkannt werden konnten.

Bei der Rattenmilch, deren Laktosegehalt sehr gering ist¹, treten diese Komplikationen nicht auf. In der Milch von normal ernährten Ratten wurde neben der Laktose ein neuer, stickstoffhaltiger «Zucker» gefunden, der nach der Hydrolyse u. a. Glukose und Galaktose lieferte. Ausserdem sind in der Rattenmilch sehr geringe Mengen von Galaktose und Spuren von Glukose vorhanden. In der Milch von Ratten, die 50 % der zugeführten Kohlenhydrate in Form von Galaktose erhielten, fanden wir den Laktose- und den Galaktoseanteil beträchtlich vermehrt².

In Frauen- und Kuhmilch konnten wir wenig Glukose und sehr wenig Galaktose nachweisen, in Frauenmilch zudem geringe Mengen einer Aldohexose, die nicht identifiziert wurde. Ausserdem fanden wir je einen stickstoffhaltigen «Zucker», der nach der Hydrolyse Galaktose, Glukose und einen Aminosucker lieferte. Im Hydrolysat des «Zuckers» aus der Frauenmilch wiesen wir zusätzlich die Aldohexose, die auch in freier Form in der Frauenmilch erkannt wurde, sowie zwei Oligosaccharide nach. Der «Zucker» aus Frauenmilch zeigte im Bifidustest³ nicht die geringste wachstumsfördernde Wirkung. (Auch der Bifiduswuchsstoff aus *B. prodigiosum*³ verliert bei papierchromatographischen Isolierungsversuchen unter Verwendung von Essigester-Pyridin-Wasser seine Wirkung.) Freie Glutaminsäure fanden wir sowohl in der Frauenmilch als auch in der Kuhmilch.

Versuche. Alle Papierchromatogramme wurden aufsteigend auf Whatman-Papier Nr. 1 ausgeführt. Als Lösungsmittelgemische dienten: A Essigester-Pyridin-Wasser⁴, B. Phenol-Wasser⁵, C. α -Picolin-Wasser⁵ und D. Isopropanol-Eisessig-Wasser⁵.

Je 6 cm³ frisch abgedrückter Frauenmilch (F.) (8 Tage *post partum*) bzw. frisch gemolkener Kuhmilch (K.) wurden mit Methanol enteiwesst. Nach der Gefrier-trocknung der Filtrate im Hochvakuum wurden die Rückstände mit Wasser aufgenommen. (Wenn die Filtrate statt im HV. auf dem Wasserbad zur Trocknung gebracht wurden, dann enthielt das F.-Konzentrat im Gegensatz zum K.- und R.-Konzentrat Laktulose und zwei weitere Substanzen, welche die Farbreaktionen von Aldohexosen gaben.)

Zur Untersuchung von Rattenmilch (R.) diente uns der Mageninhalt von a) 12 neugeborenen Ratten, die von normal ernährten Tieren abstammten. Es erhielten b) 5 Ratten eine Kost, die 30 % Galaktose enthielt⁶. Alle Tiere bekamen Linsentrübungen. Nach 72 Tagen haben 2 Tiere aus dieser Versuchsreihe geworfen. Von 5 neugeborenen Ratten wurde der Mageninhalt verwendet. Der Inhalt der Rattenmägen wurde wie oben weiterverarbeitet.

Die enteiwessten Milchkonzentrate wurden nach DECKER¹ präparativ mit (A) chromatographiert. Die Probeentwicklung auf Zucker ergab bei F. 5 Zonen und bei K. und R. je 4 Zonen, die wir von unten nach oben numeriert haben. Die Eluate wurden unter Verzicht auf eine Entsalzung mittels der Technik von KIRBY BERRY und CAIN² papierchromatographisch geprüft. Wir erkannten dabei F.II, K.II und R.II als Laktose, F.III, K.III und R.III als Galaktose und F.IV, K.IV und R.IV als Glukose. F.V gibt die Farbreaktion einer Aldohexose und besitzt in (A) einen etwas kleineren R_f -Wert als Xylose. Die Fraktionen F.I, K.I und R.I gaben eine positive Ninhydrinreaktion und Blaufärbung mit Azetylazeton/p-Dimethylaminobenzaldehyd. Sie waren nicht einheitlich und enthielten 1. freie Glutaminsäure und 2. eine Substanz, die Zuckerreaktionen gab. Nach der Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure konnte das Hydrolysat von R.I aus Materialmangel nicht auf Aminosucker untersucht werden. Galaktose und Glukose wurden darin nachgewiesen. In den Hydrolysaten von K.I und F.I fanden wir neben Glutaminsäure Galaktose, Glukose und einen Aminosucker, der bei Verwendung von (A) den gleichen R_f -Wert wie Laktose, bei Verwendung von (B) und (C), nicht aber von (D), den gleichen R_f -Wert wie Tyrosin hatte. Dieser Aminosucker gab die charakteristische rote Färbung mit Azetylazeton/p-Dimethylaminobenzaldehyd³. Im Hydrolysat von F.I erkannten wir zusätzlich F.V und 2 Oligosaccharide.

Anmerkung während der Korrektur. Aus der inzwischen erschienenen Arbeit von R. KUHN, «Vitamine der Milch», Angew. Chem. 64, 493 (1952) entnehmen wir, dass der von uns beschriebene Aminosucker mit Glukosamin und die von uns angegebene Aldohexose F.V mit Fukose identisch sein dürften.

G. MALYOTH†, H. W. STEIN,
E. HÖRMANN und R. SCHULER

Forschungslaboratorium der Universitäts-Kinderklinik,
München, den 28. August 1952.

Summary

According to our paper chromatographic tests, human, cow's, and rat's milk all contain small quantities of glucose, galactose and glutamic acid, as well as a sugar-like, nitrogen-containing substance of which the hydrolysis products were studied. In human milk only, we found a non-identified aldohexose.

¹ P. DECKER, Naturwissenschaften 38, 287 (1951).

² H. KIRBY BERRY und L. CAIN, Arch. Biochem. 24, 179 (1949).

³ S. M. PARTRIDGE, Biochem. J. 42, 238 (1948).

¹ B. L. HERRINGTON, *Milk and Milk Processing* (McGraw-Hill Book Co. Inc., 1948).

² E. HÖRMANN, Diss. München 1952 (in Vorbereitung).

³ G. MALYOTH (†), A. BAUER und E. SERICK, *Beitrag zur Wuchsstofffrage des Lactobacillus bifidus Bergey* (in Vorbereitung).

⁴ G. MALYOTH und H. W. STEIN, Bioch. Z. 322, 165 (1951).

⁵ P. DECKER, W. RIFFART und G. OBERNEDER, Naturwissenschaften 38, 288 (1951).

⁶ E. HÖRMANN, Diss. München 1952 (in Vorbereitung).

Factors Affecting Ovipositor Development in the Female Bitterling (*Rhodeus amarus* Bloch)

Rhodeus amarus, a small Cyprinid occurring in the greater part of Western Europe, lives in symbiosis with freshwater mussels (Unio, Anodonta). During the spawning period the females develop an ovipositor with which the eggs are deposited in the exhalant siphon of the mollusc. After approximately four weeks the young fish leave the mussel through the exhalant siphon to lead an independent life.

Out of the spawning period, ovipositor growth can be induced artificially by means of sexual hormones (BRET-

SCHNEIDER and DUYVENÉ DE WIT¹) and narcotics (DE GROOT and DUYVENÉ DE WIT²). This report, however, only deals with natural agents affecting the development of the ovipositor during spawning time.

MELTZER³ has shown that the ovipositor growth is subject to cyclic changes during the spawning season. At fairly regular intervals of 6–8 days, the ovipositor develops to its maximal length. Oviposition only takes place during the days on which "oviposition peaks" are produced.

Since, at least in Western Europe, the ovipositor of the female bitterling develops anew in every spring, the problem arises to what factor(s) this development is due. Is it due exclusively to the lengthening of daylight, the presence of a male and a mussel? Or is it primarily brought about by an intrinsic force or impulse inherent in the animal as such?

To answer this question the following combinations were made.

Aquarium I contained two females, one male and one mussel.

Aquarium II contained two females, no males and one mussel.

Aquarium III contained two females, two males and no mussels.

Aquarium IV contained two females only.

The experiment started on the 1st of April in Bloemfontein (South African autumn). The ovipositors were measured in anal fin units once or twice a day. One anal fin unit corresponds with 1/8th part of the stretched proximal anal fin ray. This unit can easily be estimated with the naked eye.

From the experiments, the following facts became apparent:

(1) Ovipositor growth took place in all four combinations. Obviously the presence of a mussel and/or a male is not essential for ovipositor growth under optimal laboratory conditions.

This is in conflict with the results obtained by WUNDER⁴ and MELTZER⁵. According to WUNDER the presence of a mussel only is essential to cause ovipositor growth. According to MELTZER the presence of both a male and a mussel is necessary.

As "oviposition peaks" are produced during the absence of males and/or mussels, and then during decrease in daylight length, without an increase in temperature, the oviposition stage, in our opinion, is primarily brought about by a spontaneous intrinsic force or impulse.

(2) The qualitative intrinsic ability to produce spontaneous oviposition peaks is, however, secondarily as well as quantitatively assisted by extrinsic agents. This is shown by the observation that in combination III the frequency of the ovipositor growth cycle was halved as compared with that in combination I. In combination IV the frequency was even reduced to a quarter of that in combination I.

(3) Combination II represents a remarkable case, because one of the females assumed the male mode of behaviour. She established a territory around the mussel and on ovulation days of her partner she wagtailed

around her, eventually accompanying (but not leading) her to the mussel. She imitated all the phases of male behaviour with the exception of the quivering and fertilisation movements.

The female, which retained her female mode of behaviour, produced a similar ovipositor growth cycle as the fishes in combination I. Obviously, as regards her cyclic ovipositor lengthening, it is immaterial to the female bitterling whether the male mode of behaviour which affects the frequency of the cycle, is exhibited by a male or a female provided a mussel is present.

(4) Finally the intensity of the periodical rapid increase and decrease in ovipositor length appeared to be strongly influenced by the presence of a male and a mussel. In other words: as conditions become unfavourable for the normal oviposition process, there is a tendency to retend the oviposition stage.

An extensive publication of these investigations will be published elsewhere.

Acknowledgement. This investigation was partly supported by a grant of the C. S. I. R., Pretoria.

J. J. DUYVENÉ DE WIT

Zoological Department, University of the Orange Free State, Bloemfontain, South Africa, September 18, 1952.

Zusammenfassung

Das Wachstum der Legeröhre hängt im weiblichen Bitterling vorherrschend von einem spontanen, inneren Vorgang ab. Hierauf ist er sekundär und quantitativ von äusseren Faktoren beeinflusst, unter welchen die Gegenwart eines männlichen Bitterlings und einer Teichmuschel das Wichtigste ist.

Pregnenolone and Δ^{16} -Dehydropregnenolone in Work with Oestrogen-induced Abdominal Fibroids

Contrary to progesterone, MIESCHER's Δ^{16} -dehydroprogesterone has been shown to be void of antifibromatogenic potency (LIPSCHUTZ, BRUZZONE, and FUENZALIDA, 1944)¹. Since the Δ^{16} -compound is not progestational it was originally thought that loss of antifibromatogenic potency is concomitant with the loss of progestational activity (LIPSCHUTZ, 1944). But subsequently evidence was given that increase of progestational activity of testosterone by substitution with a side chain of 2 carbons at C₁₇ is not concomitant with an increase of antifibromatogenic potency (IGLESIAS and LIPSCHUTZ, 1946; summary LIPSCHUTZ, 1950, Ch. 13). It now seems an established fact that antifibromatogenic potency and most probably antitumoral potency in general is an independent faculty of certain steroids (LIPSCHUTZ, 1946, 1947; LIPSCHUTZ, IGLESIAS, and MARDONES³, IGLESIAS, LIPSCHUTZ, and MARDONES⁴).

Antifibromatogenic steroids are, like progesterone, 3-ketosteroids (desoxycorticosterone, testosterone, dihydrotestosterone). However, against all expectation, pregnenolone has been found to be antifibromatogenic

¹ L. H. BRETSCHNEIDER and J. J. DUYVENÉ DE WIT, *Sexual Endocrinology of Non-Mammalian Vertebrates* (Elsevier Publ. Comp. Inc., New York and Amsterdam, 1947).

² B. J. DE GROOT and J. J. DUYVENÉ DE WIT, *Acta Endocr.* 3, 129 (1949).

³ J. MELTZER, *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch.* 50, 6 (1947).

⁴ W. WUNDER, *Verh. dtsch. Zool. Ges.* (1934).

⁵ J. MELTZER, *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch.* 50, 6 (1947).

¹ References before 1950: see LIPSCHUTZ, 1950².

² A. LIPSCHUTZ, *Steroid Hormones and Tumors* (Williams & Wilkins, Baltimore, 1950).

³ A. LIPSCHUTZ, R. IGLESIAS, and E. MARDONES, *Bull. Cancer* 38, 394 (1951).

⁴ R. IGLESIAS, A. LIPSCHUTZ, and E. MARDONES, *Nature* 167, 235 (1951).