精液の生化学的研究 (第2報) 牡牛の精液, 精子及び精清の トリプトファン含量に就て

岩 村 昌, 濱川 秀正, 中廣 義雄 (宮崎大學農學部農業化学科)

昭和 25 年 1 月 17 日 受理

Biochemical Studies of Semen. Part II. On the Content of Tryptophane in
Bull Semen, Spermatozoa and Seminal Fluid.

By Iwao IWAMURA, Hidemasa HAMAKAWA and Yoshio NAKAHIRO
(Laboratory of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Miyazaki University)

緒 言 ホルスタイン種牡牛の精液, 精子及び精清のトリプトファン含量を比色法で測定した。トリプトファンの定量方法としては數種あるが, その内比色法は最も結果が正確であり, 實施方法も比較的簡易であるため廣く用いられている。比色法中 FÜRTH 一派⁽¹⁾のホルマルデヒドやベンツアルデヒドを用いる方法は一般に實驗誤差が大であるとされ, MAY 及び ROSE⁽²⁾のパラ-デメチルアミノベンツアルデヒド法は測定に長時間を要し且つ生ずる青色を標準として用いたカゼインのトリプトファン含量を 1.5% として定量するのであるから, カゼインのトリプトファン含量そのものに尙検討を要する問題が残る。HOLM 及び GREENBANK⁽³⁾はこの方法を改良し, 純トリプトファンを標準としてカゼインのトリプトファン含量を測り, これを 2.4% とした。併しこの方法は尙測定に時間を要する缺點があるので, SULLIVAN 等⁽⁴⁾は試料を 85° に 15 分加熱し, 過酸化水素を加えることによつて定量時間を著しく短縮することが出来たが, この方法もカゼインのトリプトファン含量を 2.4% として標準に用いている。然るに SHAW 及び MCFARLANE⁽⁵⁾によるとトリプトファンに最も適確な固有反應を示す Glyoxylic acid を用いて定量すると, カゼインのトリプトファン含量はカゼインの原料や貯藏の新古によつて可なり差異があるという。而も MAY 等⁽²⁾の方法によると遊離トリプトファンと蛋白質分子中にある當量のトリプトファンとは同一強度の呈色をしないことを證明し, Glyoxylic acid 法や紫外線 Spectrophotometry の約 2 倍に相當する値を示している。これ等の數值的比較については考察に於て述べるが, SHAW 氏法の合理性はトリプトファン誘導體についても證明され, EVANS 等⁽⁶⁾も下垂體前葉プロラクチンの定量にこの方法を用いている。次にトリプトファンの定量方法として STREPKOV 及び MAVLIANOV⁽⁷⁾はオキシアルデヒドのバニリンを用いる定量法を發表しているが, この方法は著者⁽⁸⁾の實驗によると卵アルブミン及びラクトプロラクチンのバリタ分解物で, グリオキシル酸法の 100 に對してそれぞれ 75.4 及び 73.7% を示し, 正確度が高く精液, 卵白のような生理的物質に對して比色上何等支障を來たさないことが判つたので, この研究では本法を主としこれにグリオキシル酸法を併用してトリプトファンの測定を行い, その結果を吟味した。

實 驗 方 法

1. STREPKOV-MAVLIANOV 氏法によるトリプトファンの定量 トリプトファンは濃硫酸の存在の下に Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) と結合して赤紫色を呈するが, この色はトリプトファンの濃度に比例する。本研究ではこの方法に多少の改變を加え, 次のように定量を行つた。

(1) 所要試薬: a: 95% 酒精に溶解した 2% バニリン液。b: 濃硫酸。

(2) トリプトファン標準液: L-トリプトファン (小島化學藥品株式會社, mp. 289~290°) 5mg を 0.1N 硫酸液に溶解し 100 cc とする。

(3) 定量實施方法: 精液, 精子又は精清 1.6~5.9 g を 40~45 時間バリタ分解に處し, 硫酸でバリウムを除き, 水を加えて 25~100 cc とし, その分解液 1~4 cc に a 液 1 cc 及び b 液 4 cc を加え生ずる赤紫色を同量の標準液の色と DUBOSQ 氏比色計で測定した。なお著者等はバニリン法を用い, 試料をバリタ分解しないで新鮮物の一定量に上記の方法を適用し, 迅速にトリプトファンの測定が可能であることを知り, Table 3 に示すように精液, 精子及び精清及び卵アルブミンにこれを試み, 良好なる結果が得られることを見出した。

2. SHAW-MCFARLANE 氏法によるトリプトファンの定量 本法によれば蛋白質を分解しないで、蛋白質分子中のトリプトファンを遊離トリプトファンと當量的に定量出来るが、精液及び精子ではグリオキシル酸特有の青紫色又は赤紫色が帶黄褐色を呈し、特に比色時の透過光線によつて比色が妨げられる。これは橙赤色フィルターで或る程度補正出来るので、バニリン法の結果と比較検討に用いることが出来た。

(1) 所要試薬：a: HOPKINS-COLE 試薬の調製⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ Mg 粉末を小フラスコに入れ水で湿し、これを水で冷却しながら 50 cc の飽和醋酸液を徐々に加へる。反應進行と共に白色不溶解の醋酸マグネシウムが生ずるが、反應を完了するため 12 時間放置した後濾過し、濾液を真空蒸發し、氷醋酸 15 cc と更に水を加えて 100 cc とする。b: 濃硫酸。

(2) 定量實施方法： 定量方法はバニリン法に準ずる。但し兩法共に蛋白質の乾燥物に對しては 15~50 mg に 15% NaOH 0.5 cc 及び水 3.5 cc を加えて湯浴上に 3 分間加熱溶解した後、溶液を 4 cc とし、グリオキシル酸試薬を加えて定量する。但し精子や卵アルブミンをよく分散又は溶解し、NaOH を加えないで定量が可能であることを知り、後にこれを實施した。

3. 精液、精子及び精清の水分の測定 精液各區分の水分測定に於て精液 HS 1 (Table 1) は 1.5509 g を 2 分し、0.8815 及び 0.6694 g とし、恒量の 25 cc 7 秤量壺にとり常法により蒸熱乾燥し恒量を得たものである。又 HS 7 及び 8 の精子の水分は豫め遠心沈澱管を恒量としおき、前項のように沈澱管に分離し固く沈積した精子層は管底に残したまま數分間濾紙上に倒立させた後、精子層の表面に觸れぬよう濾紙で管内壁の水分を拂拭し去り、更に外部の水分を完全に拭い取つて秤量し新鮮物の重量を求めた。次に水分の定量は沈澱管と共に上記同様に取扱い、又精清の水分測定も全く上記同様である。それ等 3 區分の乾燥物の状態は乾燥に従い器底、壁からよく離れ淡く黄褐色を呈したアルブミン乾燥物状となつたが、バリタ分解に處する際は内容物を採り出した後、上記容器内を水又はバリタの少量でよく洗い分解用器内に完全に移すようにした。

實 驗 結 果

Table 1. Tryptophane Content of Holstein Bull Semen

Semen No.	Semen (g)	Water of semen (%)	Tryptophane per 100 g of semen (mg)	Tryptophane in dried semen (%)
HS 1	1.5509	89.94	151.1	1.49
HS 2	2.2541	—	128.8	1.28*
HS 3	2.0882	—	145.7	1.45*
Average	1.9644	89.94	141.9	1.41

* calculated from water content of HS 1.

リン法とグリオキシル酸法を適用したが、その結果は Table 2 に示した通りである。即ちその平均値からみる

Table 2. Tryptophane Content of Spermatozoa and Seminal Fluid.

Semen No.	Tryptophane in spermatozoa				Tryptophane in seminal fluid				Ratio, trypto- phane of dried spermatozoa to that of dried seminal fluid
	Glyoxylic acid method		Vanillin method		Glyoxylic acid method		Vanillin method		
	mg per 100 g of the fresh substance	per cent on the dry basis	mg per 100 g of the fresh substance	per cent on the dry basis	mg per 100 g of the fresh substance	per cent on the dry basis	mg per 100 g of the fresh substance	per cent on the dry basis	
HS 4	222.3	2.03	111.7	1.02	288.2	3.22	190.6	2.13	1 : 2.09
	145.6	1.33	107.3	0.98	220.2	2.46	201.4	2.25	1 : 2.30
HS 5	101.8	1.53	75.6	1.14	284.8	3.13	202.0	2.22	1 : 1.95
			71.4	1.07			176.5	1.94	1 : 1.81
HS 7			167.9	0.95			230.5	2.32	1 : 2.44
			189.1	1.07			215.6	2.17	1 : 2.03
HS 8			180.3	1.02			233.4	2.35	1 : 2.30
			189.7	0.94			224.8	2.16	1 : 2.30
			229.3	1.14			235.2	2.26	1 : 1.93
			225.4	1.12			218.5	2.10	1 : 1.88
Aevrage	156.6 ?	1.63 ?	197.0	1.05	264.4	2.93	212.9	2.19	1 : 2.11

と精子のトリプトファン含量はバニリン法で乾燥物中 1.05 %, 新鮮物 100 g 中 197.0 mg である。グリオキシル酸法では精子分解物は肉眼的には淡褐紫色を呈し、比色時透過光線では淡黄褐色に近くなり、比色が困難であるから、その数値については尙検討の餘地がある。然るに精清の分解物についてはバニリン法はよく適合し、グリオキシル酸法も光學的な障害を受けることがないから、兩法共に正確な値であることが確言できる。但しバニリン法よりもグリオキシル酸法が常に値が高いことは考察の項で検討することにした。何れにしても乾燥物についていへば精清のトリプトファンは精子の2倍量に近いものである。

3. 精液、精子及び精清の新鮮物について直接トリプトファンを定量する方法

(1) バニリン法の適用： 第1報所載のように精液の試料番號 HS 9, 3.5015 g を遠心分離して精子と精清とに分け、精子は更に生理的食鹽水で2回、蒸留水で2回洗滌し、その各に水を加えて15~30 cc に稀釋し、Table 3 に示したようにその中から2~4 cc をとり、水を加えて4 cc とし、これを第3試料とした。次に各にバニリン試薬 1 cc 及び濃硫酸 4 cc を加えて放置し、15分後冷却して比色定量を行つた。別に卵アルブミン A (Ernst Leitz, Berlin) 及び B (小島薬品株式會社) についても測定を行い、各液に 15 % NaOH 0.5 cc 宛を加えて3分湯浴上に加熱し、精子及び蛋白質の溶解を促し、透明液について實驗を行つた(實驗番號3)が、アルカリを加えない試料と値はよく一致した。呈色の状態は肉眼的には何れも赤紫色を呈するが、比色時の視野は精子及び精液の試料のみやや淡黄褐色を呈した。測定値をみると新鮮物 100 g 中のトリプトファンは精液、精子及び精清についてそれぞれ 201.7, 329.2 及び 213.1 mg となり、バリタ分解物で得た値の 141.9, 197.0 及び 212.9 mg に比すると精清の値には差異がみられないが、精液及び精子ではバリタ分解物の値よりもそれぞれ 42.2 及び 67.1 % 高い。同様にして卵アルブミンの値も分解せずに直接定量したものが 145.7 % 大なる結果が得られた。

Table 3. Tryptophane Determination in Biological Materials by Vanillin Method.

Material	Semen	Spermatozoa	Seminal fluid	Egg albumin A (mg)			Egg albumin B (mg)			Control, Tryptophane (mg)	
Sample (1) g	1.0220	0.4524	0.8316	203	16.9	16	200	16	17	4.8	5.0
" (2) cc	20	15	30	80	3.5	3.5	80	3.5	3.5	100.0	100
" (3) cc	3	2	3	4	3.5	3.5	4	3.5	3.5	4	4
Color development	reddish violet	〃	〃	〃			卅			〃	
Intensity of color	卅	卅	卅	卅			〃			卅	
Color tone in the field of vision	reddish violet, somewhat brownish	somewhat brownish yellow	reddish violet	〃			〃			〃	
Colorimetric reading, (mm.)	13.8	22.8	23.2	19.4	11.1	10.5	18.4	12.4	10.9	21.0	20.3
Tryptophane mg in sample (3)	0.290	0.185	0.172	0.206	0.38	0.36	0.22	0.32	0.36	0.190	0.197
Tryptophane mg in sample (2)	1.93	1.31	1.72	4.12	0.38	0.36	4.35	0.32	0.36	4.75	4.93
Tryptophane mg per 100g of the materials, Exp. 1	189.0	290.0	206.8	per cent			per cent				
" 2	201.6	334.9	223.2	2.06 2.35 2.25			2.16 2.02 2.11				
" 3	214.5	317.8	210.4								
Average	201.7	329.2	213.1	2.33			2.10				

(2) グリオキシル酸法の適用： グリオキシル酸の反應は純トリプトファン及び精清、卵アルブミンに於ては紫色となつたが精液に於てはやや赤紫色、精子では薄い紫紅色を呈した。併し比色計の視野は RIDGWAY⁽¹¹⁾ の Color Standards に比較してそれぞれ Table 4 のようになる。即ち精子反應液は反射光で淡紫紅色を呈し、透過光で淡灰黄色又は淡褐黄色を呈し、この傾向は僅かであるが精液反應液にも見られる。試みに精子反應液と精清反應液とを混合すると、反射光では殆ど同色同調となり、比色計の視野では精液反應液の色に近いが、正確には比色計の讀度 15.1 mm で色調は Color Standards の Plate 40, avellaneous となり、結局精子中にはバ

Table 4. Tryptophane Determination in Biological Materials by Glyoxylic Acid Method.

Material	Semen	Spermatozoa	Seminal fluid	Egg albumin A	Egg albumin B	Standard, 5 mg tryptophane in 100 cc
Sample (3) cc.	1.5	2	3	4	4	4
Color development	light purplish red	slightly dim and somewhat purplish pink	violet	//	//	//
Color tone in the field of vision	Plate 39, light purplish vinaceous	Plate 29, pinkish buff	Plate 37, light pinkish lilac	Plate 44, deep vinaceous lavender	Plate 44, vinaceous lavender or deep v. lavender	Plate 44, deep vinaceous lavender
Tryptophane Colorimetric reading (mm)	18.2 ?	22.5 ??	13.0	11.8	11.5	15
Tryptophane mg in sample (3)	0.165 ?	0.133??	0.230	0.254	0.265	0.2
Tryptophane mg in sample (1)	2.20 ?	1.005??	2.30	2.54	2.65	5.0
Tryptophane mg per 100 g of the materials No. 1	215.2 ?	222.1??	276.6	Per cent 1.27	Per cent 1.31	
No. 2	204.9 ?	216.7??	255.8	1.19	1.38	
Average	210.1 ?	219.4??	266.2	1.23	1.35	

ニリンよりもグリオキシル酸に對してアルデヒド反應を妨げる物質が存在し、而もこの物質は透過光線でトリプトファン反應の紫色を完全に吸収することが判つた。従つて精子のトリプトファン測定値を掲げたが、この値は尙正確を期し難い。併し精清に於ては發色は純トリプトファン及び卵アルブミンによく同調し、而もバリタ分解物の値とよく一致した。

4. 牝牛精液中の精子の數及び精子 1 個の重量 精液採取直後沈下せんとする精子をよく混合分散させ、血球計算法に準じ THOMA-ZEISO 氏血球計算器のピペットで目盛 0.5 まで吸い採り、次に 3% 食鹽液を採り 101 度まで充たし、よく振り混合した後ピペットの先端區分の稀釋液を除き 1 滴を計算に用いた。次に計算オブジェクトガラスの 1 區劃の數を測り、 $\times 400$, $\times 200$, $\times 100$ 倍して精液 1 mm³ 中の精子の數とした。これによつて本研究に用いたホルスタイン種牝牛の精液 1 mm³ には平均 115.7 萬の精子がいたことになる。

Table 5. Number of Spermatozoa in Bull Semen.

Semen No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Average
Number of spermatozoa in 1 mm ³ of semen	—	1,040 $\times 10^3$	1,196 $\times 10^3$	—	808 $\times 10^3$	1,420 $\times 10^3$	1,292 $\times 10^3$	1,186 $\times 10^3$	—	1,157 $\times 10^3$

次に Table 6 に示すように遠心分離法によつて殆ど完全に精液中から精子を分離し得たが、その結果から精子 1 個の重量を次のようにして計算した。即ちこの研究に用いた牝牛の精液の比重は、本學畜産學科教授三村 一博士及び同教室員の測定によれば、1.024~1.037 平均 1.032 であるから、1 mm³ は 0.001032 g になる。然る

Table 6. Weight of One Bull Spermatozoon.

Semen No.	Semen	Spermatozoa	Number of spermatozoa in 1 mm ³ of semen	Weight of one spermatozoon
	(g)	(g)		(μ g)
HS 7	4.3643	0.3207	1,292 $\times 10^3$	5.87 $\times 10^{-5}$
HS 8	4.9004	0.4384	1,186 $\times 10^3$	7.78 $\times 10^{-5}$
HS 9	3.5015	0.4524	1,157 $\times 10^3$	11.52 $\times 10^{-5}$
Average	4.2554	0.4038	1,212 $\times 10^3$	8.39 $\times 10^{-5}$

に精液 HS 7 の 4.3643 g 中には 0.3207 g の精子を含むから、精液 0.001032 g 中には 7.58×10^{-5} g の精子を含むことになる。次に精子 7.58×10^{-5} g は精子數 $1,292 \times 10^3$ 個の占める重さであるから、精子 1 個の重さは $5.87 \times 10^{-5} \mu$ g となる。同様にして HS 8, 9 の重さを求め、精子 1 個の重量は平均 $8.39 \times 10^{-5} \mu$ g となつた。この値は精子の頭長 8.983

~9.165 μ , 頭巾 4.5 μ 及び精子體全長が 65 μ とし, 又精子の頭部は扁平卵圓形であるが, 頭長を直径とする球體に頭部及び尾部を全部納め得たと假定し, 精液の比重を含めて計算すれば精子 1 個の重量は $6.57 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ となるが, 上記實測値はこれに極めて近いものであることが判つた。

考 察

トリプトファンの比色定量に用いるアルデヒド中, グリオキシル酸が最も合理的であることを SHAW 他⁽⁵⁾が證明したが, この値を著者等の實驗結果及び他の文獻の数値と比較検討すると Table 7 のようになる。即ちカゼインについて MAY 他⁽²⁾及び SULLIVAN⁽⁴⁾法はグリオキシル酸法の値の 200% になり, バクタ分解物及び純トリプトファンで尙 SULLIVAN 法は値が高い。グリオキシル酸法の結果を FOLIN 他⁽¹³⁾法と比較すると後者が約 50% となり, 結局 SULLIVAN 法の 1/4 に相當する。著者が行つたラクトプロラクチン⁽⁸⁾のバリタ分解物について STREPKOV 法⁽⁷⁾を適用した値と, 分解しないで直接グリオキシル酸法を適用した値とでは, 前者が 71.4% を示し, FOLIN 法より優れていることが判明した。併しバニリン法を分解しない卵アルブミンに用いるとグリオキシル法の 171% を示し, バリタ分解物の値より 125% 多く, FOLIN 法に近い値を示している。次に精液, 精子及び精清についてグリオキシル酸法とバニリン法とを比較すると, 精清で後者 100 に對して前者 124 及び 125% の値で, 加水分解物も分解しないものもほぼ一致し, 測定は完全に行われたが, 精子は何れの試料に於てもバニリン法でよく發色し, グリオキシル酸法で發色が妨げられている。即ちグリオキシル酸法の反應液は反射光で僅かに帶紫紅色を帶び, 比色計の視野では全然別種に近い Table 4 のような呈色を示し, トリプトファンよりも鋭敏にグリオキシル酸に反應する物質が存在することを示した。この現象は精子を含む精液に於ても輕度に見られ, 結局この現象はトリプトファンとアルデヒドの生成物の消光係数が不明であるから確言できないがアニリン色素の示す表面色と餘色の關係と異なり, 精子反應液には反射光により示すトリプトファンの呈色を透過光により 1 部選擇吸收させ, その餘色の形で視野が黄灰色に近いものとなる物質の存在することが考えられる。このことは精子の化学的成分の追究によつて明かにされる時期が來ることが考えられ, 又精子に對するグリオキシル酸及びバニリンの態度の差異も自ら明かになると思う。尙精子 1 個の重量は平均 $8.39 \times 10^{-8} \text{mg}$ であ

Table 7, Comparison of Tryptophane Determinations.

Substances tested	p-Dimethylaminobenzaldehyde method		Glyoxylic acid method		Phenol reagent method		Vanillin method		Bibliography
	May and Rose's method (mg)	(%)	Sullivan's method (mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	
Casein 100 mg (air-dried)	2.4	200	2.5	208	1.2	100			SHAW et al. ⁽⁵⁾
" 100 mg (baryta hydrolysate)	1.3	108	1.9	158	1.2	100			"
Tryptophane	1.0	100	1.5	150	1.0	100			"
Beef prolactin 100 mg					2.6	100			EVANS et al. ⁽⁶⁾
Sheep prolactin 100 mg					2.45	100			" ⁽¹²⁾
Lactoprolactin 100 mg					2.55	100	1.82	71.4	IWAMURA ⁽⁸⁾
Egg albumin 100 mg (commercial)						1.30			FOLIN et al. ⁽¹³⁾
" 100 mg (crystal)						1.16			"
" 100 mg						1.13			BERNHART ⁽¹⁴⁾
Egg albumin 100 mg (vacuum dried)					1.30	100	2.22	17.1	IWAMURA ⁽⁸⁾
" 100 mg (baryta hydrolysate)					1.20	100	0.91	75.8	"
Bull semen 100 g (fresh substance)					210.1?	104	201.7	100	
" 100 g (baryta hydrolysate)							141.9		
Bull spermatozoa 100 g (fresh substance)					219.4??		329.2		
" 100 g (baryta hydrolysate)					156.6??		197.0		
Bull seminal fluid 100 g (fresh substance)					266.2	125	213.1	100	
" 100 g (baryta hydrolysate)					264.4	124	212.9	100	

るが、バリタ分解物でその重さの $1/506$ が精子 1 個の有するトリプトファン及び $1/225$ がチロシン含量となる。

摘 要

1. グリオキシル酸及びバニリン法によつてホルスタイン種牝牛の精液、精子及び精清中のトリプトファンを比色定量した。バニリン法は他のアルデヒド法より精液及び精子のトリプトファンの測定には有利で、且つ少量の試料で充分な結果が得られた。

2. 新鮮物 100 g 當りのトリプトファンの平均含量は精液 141.9, 精子 197.0 及び精清 212.9 mg で、乾燥物についてはそれぞれ 1.41, 1.05 及び 2.19 % となる。

3. 乾燥物については精子中のトリプトファンの精清中のトリプトファンに対する比は 1 : 2.11 である。

4. 生理的物質の新鮮物中のトリプトファンの迅速な定量法について述べ、その測定結果がバリタ分解物についての値とよく一致することを見出した。

本研究に於て精液の比重の値を與えられた本學教授三村 一 博士及び教室員の御好意に感謝する。

(この研究報告は昭和 24 年 10 月 22 日熊本市で開かれた日本農藝化學會西日本支部例會で講演した)

- (1) O. FURTH et al : *Biochem. Z.* 109, 103 (1920) ; *Ibid.* 109, 103 (1920) ; 124, 293 (1923)
- (2) C. E. MAY and E. R. ROSE : *J. Biol. Chem.* 54, 213 (1922)
- (3) C. E. HOLM and G. R. GREENBANK : *J. Biol. Chem.* 45, 2788 (1923)
- (4) M. X. SULLIVAN, H. S. MILONE and E. L. EVERITT : *J. Biol. Chem.* 125, 471 (1928)
- (5) J. L. D. SHAW and W. D. MCFARLANE : *Can. J. Research.* 16, 361 (1938) ; *J. Biol. Chem.* 132, 387 (1940)
- (6) C. H. LI, W. R. LYONS and H. M. EVANS : *J. Biol. Chem.* 140, 43 (1941)
- (7) S. M. STREPKOV and J. M. MAVLIANOV : *Bull. Biol. Med. Expt.* 6, 242 (1938)
- (8) 岩村及び中廣 : 日本畜産學會報, 21, 51 (1950)
- (9) S. R. BENEDICT : *J. Biol. Chem.* 6, 51 (1909)
- (10) F. G. HOPKINS and S. W. COLE : *Proc. Roy. Soc. London* 68, 21 (1901)
- (11) R. RIDGWAY : *Color Standards and Color Nomenclature.* (1912)
- (12) C. H. LI, W. R. LYONS and H. M. EVANS : *J. Biol. Chem.* 140, 43 (1941)
- (13) F. FOLIN and A. D. MARENZI : *J. Biol. Chem.* 83, 103 (1929)
- (14) F. W. BERNHART : *J. Biol. Chem.* 132, 189 (1940)

Summary

Colorimetric determinations of tryptophane by the methods with glyoxylic acid and with vanillin were made on the semen, spermatozoa, and seminal fluid of Holstein bulls. It was pointed out that the latter method was more convenient for the estimation of tryptophane in hydrolyzates of semen and spermatozoa. Furthermore, the samples of smaller amount were sufficient for measuring.

The average values of tryptophane per 100 g. of the fresh samples were, semen 141.9, spermatozoa 197.0, and seminal fluid 212.9 mg.; these values were, respectively, 1.41, 1.05, and 2.19 per cent on the dry basis.

The ratio of tryptophane in spermatozoa to that in seminal fluid averaged 1 : 2.11 on the dry basis.

A rapid method was described for determining tryptophane in the fresh samples of physiological materials. The results of such a determination were found to agree well with those obtained in the baryta hydrolysates.