

Originalarbeiten

Cystinhaltige kurzkettige Peptide als potentielle Cystinquelle in der parenteralen Ernährung*)

L. Pollack, P. Stehle, S. Albers und P. Fürst

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft
Universität Hohenheim, Stuttgart

Zusammenfassung: Erstmals wurde die in vivo-Verwertung von zwei sehr gut löslichen und thermisch stabilen cystinhaltigen synthetischen Peptiden, N,N'-Bis-L-Alanyl-L,L-cystin und N,N'-Bis-Glycyl-L,L-cystin, bei Ratten untersucht. Nach Verabreichung eines intravenösen Peptidbolus wurden innerhalb von 5 Minuten mehrmals Blutproben aus der Vena cava inferior entnommen und die Plasmakonzentrationen der Aminosäuren/Peptide mittels RP-HPLC nach Vorsäulenderivatisierung mit Dansyl-Chlorid bestimmt. Das injizierte Peptid wurde jeweils rasch aus dem Plasma eliminiert (geschätzte Eliminationshalbwertszeit: 4 min für das Glycylpeptid und weniger als 2 min für das Alanylpeptid). Die hohen Anfangskonzentrationen an den unsymmetrischen Disulfiden N-L-Alanyl-L,L-cystin bzw. N-Glycyl-L,L-cystin sowie der sofortige Anstieg der freien Aminosäuren Alanin, Glycin und Cystin weisen auf eine sehr schnelle, in zwei Stufen ablaufende Hydrolyse der Peptide im Extrazellulärraum hin, vermutlich katalysiert durch gelöste und/oder plasmamembrangebundene Peptidasen. Die beobachtete rasche Hydrolyse kann als erster Beweis dafür dienen, daß kurzkettige Peptide mit C-terminalem Cystinrest als Quellen für freies Cystin im Rahmen einer parenteralen Ernährung eingesetzt werden können.

Summary: For the first time, in vivo utilization of two highly soluble and stable cystine containing synthetic short chain peptides, N,N'-bis-L-alanyl-L,L-cystine and N,N'-bis-glycyl-L,L-cystine, was investigated in adult rats. Within 5 min after an intravenous bolus, blood samples were drawn (inferior vena cava) and plasma amino acid and peptide levels were determined using RP-HPLC (precolumn derivatization with 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonylchloride). Both peptides were rapidly cleared from plasma (estimated elimination time: 4 min for the glycyl peptide and less than 2 min for the alanyl peptide). The initial high amounts of N-L-alanyl-L,L-cystine and N-glycyl-L,L-cystine as well as the prompt increase of the constituent free amino acids alanine, glycine and cystine strongly suggest that the peptide disappearance is mainly due to a very fast two-step hydrolysis in the extracellular compartment, presumably catalyzed by soluble and/or plasma membrane bound peptidases. The observed rapid hydrolysis may serve as first evidence that short chain peptides with C-terminal cystine residue may represent efficient sources of free cystine in parenteral nutrition.

Schlüsselwörter: Cystin; Peptide; In vivo-Verwertung; parenterale Ernährung

Key words: cystine; peptides; in vivo utilization; parenteral nutrition

*) Herrn Prof. Dr. med. Karl Heinz Bässler zum 65. Geburtstag gewidmet

Einleitung

Cyst(e)in zählt zu den nichtessentiellen Aminosäuren, da bei gesunden Erwachsenen eine ausreichende körpereigene Synthese aus Methionin via Transsulfurierung gewährleistet ist (19). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß dieser Stoffwechselweg bei Früh- und Neugeborenen noch nicht voll ausgebildet (14, 23, 26, 35) und bei Patienten mit Lebererkrankungen (9, 25) beeinträchtigt ist. Aufgrund der dadurch bedingten ungenügenden endogenen Cystinbiosynthese sollte in diesen Fällen Cyst(e)in exogen zugeführt werden. Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit von Cystin (0,1 g/l H₂O bei 20 °C) und der Instabilität von Cystein in wäßrigen Lösungen (25) ist es jedoch nicht möglich, diese Aminosäuren in ausreichenden Mengen parenteralen Nährösungen zuzufügen. Folglich wurde wiederholt berichtet, daß eine parenterale Ernährungstherapie bei Neugeborenen (23, 27, 28, 37) sowie bei Kranken mit Leberzirrhose (9, 24, 25) und bei mangelernährten Patienten (8) zu einem erniedrigten Cystinspiegel im Plasma führt.

Neue Kenntnisse über die Verwertbarkeit intravenös verabreichter Di- und Tripeptide (1, 11) eröffnen die Möglichkeit, gegenwärtig erhältliche Aminosäurelösungen mit geeigneten kurzkettigen Peptiden zu substituieren. Unter Verwendung chemischer und/oder biotechnologischer Methoden gelang uns die Synthese von mehreren stabilen und sehr gut löslichen cystinhaltigen Peptiden (30–32), die somit als potentielle Substrate für die parenterale Ernährung angesehen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die *in vivo*-Verwertung von zwei cystinhaltigen Peptiden, N,N'-Bis-L-Alanyl-L,L-cystin ([Ala-Cys]₂) und N,N'-Bis-Glycyl-L,L-cystin ([Gly-Cys]₂) nach Bolusinjektion bei der Ratte untersucht.

Material und Methoden

Peptide

Die cystinhaltigen Peptide (Ala-Cys)₂ und (Gly-Cys)₂ wurden nach der N-Carboxy-Anhydrid-(NCA-)Methode synthetisiert und wie früher beschrieben in unserem Labor gereinigt (16, 30, 32, 33). Die wichtigsten physikalisch-chemischen Eigenschaften der Peptide sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Reinheit der isolierten Produkte betrug annähernd 100 %. Beide Peptide erwiesen sich während 15minütiger Vakuumsterilisation bei 121 °C als stabil. Die Löslichkeit der Peptide liegt ca. 5000fach höher als diejenige für freies Cystin.

Tab. 1. Physikalische und chemische Eigenschaften der synthetischen Peptide (Gly-Cys)₂ und (Ala-Cys)₂.

	(Gly-Cys) ₂	(Ala-Cys) ₂
Optisch-chemische Reinheit	> 99 %	> 98 %
Löslichkeit	541 g/l	> 500 g/l
Stabilität während der Hitzesterilisation (121 °C, 15 min)	100 % Wiederfindung	100 % Wiederfindung

Versuchsaufbau

Die Untersuchungen zur in vivo-Verwertung von (Ala-Cys)₂ bzw. (Gly-Cys)₂ wurde an 300-400 g schweren männlichen Wistar-Ratten (Süddeutsche Versuchsfarm, Tuttlingen, BRD) durchgeführt.

Zur Einleitung der Narkose wurde den Tieren intramuskulär 0,1 ml Valium® (Diazepam, Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) und 0,1 ml Megaphen® (Chlorpromazin, Bayer AG, Leverkusen, BRD; 1:2 verdünnt mit physiologischer NaCl-Lösung) injiziert. Nach der Sedierung wurden die Ratten mit Ketanest® (Ketamin, Park-Davis, München, BRD; 0,2 ml intramuskulär) narkotisiert. Ein Silikonkathe-

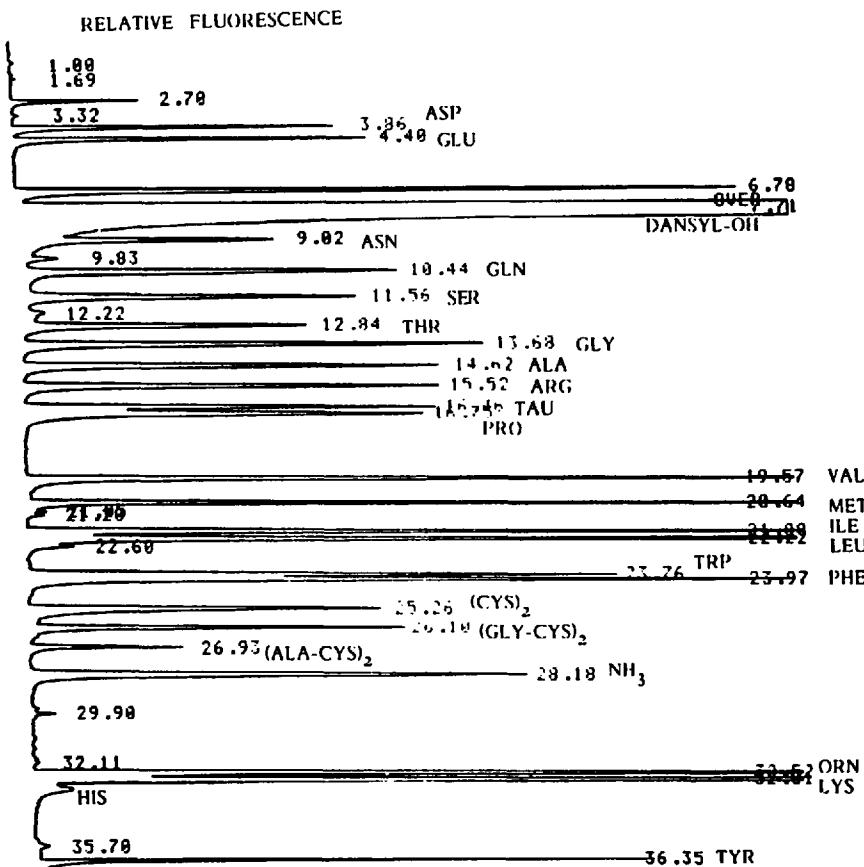


Abb. 1. Chromatogramm eines Standardgemisches mit 22 Aminosäuren (inklusive Cystin) und den Peptiden (Gly-Cys)₂ und (Ala-Cys)₂ nach Vorsäulenderivatisierung mit Dansyl-Cl. Injektionsmenge 20 µl, entsprechend 40 pmol Aminosäure bzw. Peptid mit Ausnahme von Cystin (20 pmol). Analytische Bedingungen: Die Trennung erfolgte auf einer Spherisorb ODS II, 3 µm Säule (125 x 4,6 mm) mittels Gradientenelution (Eluent A: 3 % Tetrahydrofuran in 15 mM Na-phosphat-puffer, pH 6,3; Eluent B: 60 % Acetonitril in 15 mM Na-phosphat-puffer, pH 6,3). Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregung von 330 nm und einer Emission von 550 nm gemessen.

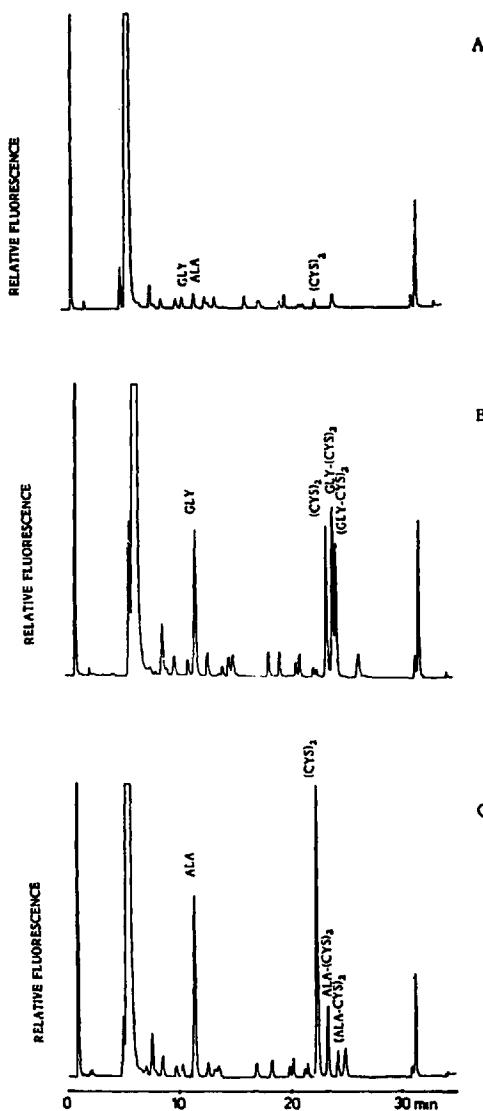


Abb. 2. Elutionsprofil von Plasmaproben direkt vor (A) und 30 Sekunden nach Bolus-Injektion von $(\text{Gly-Cys})_2$ (B) und $(\text{Ala-Cys})_2$ (C). Analytische Bedingungen siehe Abb. 1.

ter wurde in die rechte Vena subclavia eingeführt und in der Vena cava superior fixiert (10). Die Blutentnahme erfolgte mittels einer Kanüle in der Vena cava inferior.

Nach der Katheterisierung wurde sechs Ratten ein Bolus von 200 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KG $(\text{Ala-Cys})_2$ oder $(\text{Gly-Cys})_2$ (100 mM in physiologischer Kochsalzlösung) jeweils innerhalb von fünf Sekunden injiziert. Die Blutentnahme (ca. 1 ml) erfolgte mit heparinisierten Spritzen vor sowie 30, 60, 120, 180 und 300 Sekunden nach der

Bolusinjektion. Nach der letzten Probenentnahme wurden die Ratten mit einer Überdosis Ketanest getötet. Bei einigen Tieren wurden Gewebeproben (Muskel, Niere) entnommen und entsprechend früheren Arbeiten für die Bestimmung der intrazellulären Aminosäure/Peptid-Konzentrationen aufgearbeitet (17). Die Blutproben wurden sofort zentrifugiert ($2800 \times g$, 5 min), das so erhaltene Plasma mit Sulphosalicylsäure (30 mg/ml Plasma) enteiweißt und 60 min bei 4°C aufbewahrt. Das proteinfreie Filtrat wurde bis zur Analyse bei -70°C gelagert (7).

Aminosäuren- und Peptidanalytik

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen an freiem Cystin, Alanin und Glycin sowie an $(\text{Ala-Cys})_2$, $(\text{Gly-Cys})_2$ und ihren Hydrolyseprodukten N-L-Alanyl-L,L-cystin (Ala-Cys_2) bzw. N-Glycyl-L,L-cystin (Gly-Cys_2) erfolgte mittels RP-HPLC unter Verwendung einer bereits früher beschriebenen Gradienten-HPLC-Anlage (15, 17). Die Proben wurden mit einem Spark Autosampler SP 125 (Emmen, Niederlande), ausgestattet mit einem Rheodyne-7010-Injektionsventil (Cotati, Ca, USA) und einer 20- μl -Probenschleife, injiziert. Manuelle Vorsäulenderivatisierung mit 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulphonylchlorid (Dansyl-Cl) (36) ermöglichte die gleichzeitige fluorimetrische Detektion (Modell F 1000, Merck-Hitachi, Darmstadt, BRD) von cystinhaltigen Peptiden und freien Aminosäuren (Abb. 1). Unter den angewandten analytischen Bedingungen und einem Signal/Rausch-Verhältnis von 2,5 betrug das Detektionslimit für die freien Aminosäuren und die Glycylpeptide 1,0 pmol und für die Alanylpeptide 2,0 pmol pro Injektion.

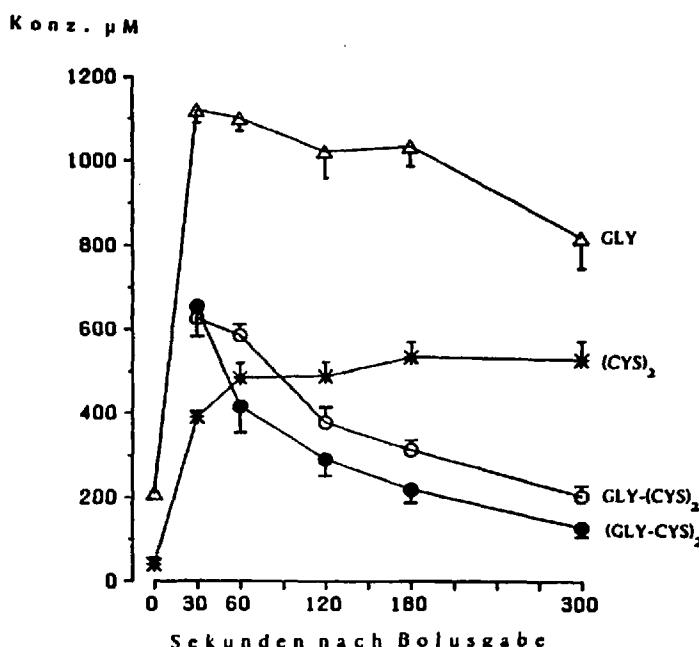


Abb. 3. Verlauf der Plasmakonzentrationen des injizierten Peptids $(\text{Gly-Cys})_2$, des freigesetzten monosubstituierten Produktes Gly-Cys_2 sowie der freien Aminosäuren Glycin und Cystin bei 6 Ratten (Mittelwert \pm SEM).

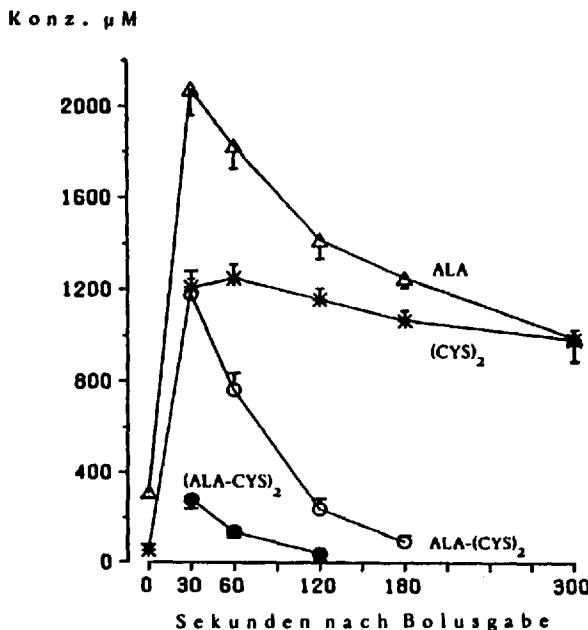


Abb. 4. Verlauf der Plasmakonzentrationen des injizierten Peptids (Ala-Cys)₂, des freigesetzten monosubstituierten Produktes Ala-(Cys)₂ sowie der freien Aminosäuren Alanin und Cystin bei 6 Ratten (Mittelwert \pm SEM).

Ergebnisse

Abbildung 2 zeigt typische HPLC-Chromatogramme von Plasmaproben, die direkt vor (A) und 30 Sekunden nach Peptidinjektion (B, C) entnommen worden waren. Neben den injizierten Peptiden sind die entsprechenden freien Aminosäuren sowie die monosubstituierten Peptide in hohen Konzentrationen nachweisbar.

Die nach Bolusinjektion von (Gly-Cys)₂ bzw. (Ala-Cys)₂ gemessene Peptidkonzentrationen im Plasma sind in Abbildung 3 bzw. Abbildung 4 graphisch dargestellt. Die Konzentration von (Gly-Cys)₂ nimmt kontinuierlich ab und beträgt am Ende nur noch 10 % des nach 30 Sekunden gemessenen Wertes. Interessanterweise verlief die Elimination des monosubstituierten Peptids Gly-(Cys)₂ parallel zu der von (Gly-Cys)₂. Aus Abbildung 4 wird deutlich, daß (Ala-Cys)₂ rasch aus dem Plasma verschwindet und 3 Minuten nach der Bolusinjektion nicht mehr detektierbar war. Es ist beachtenswert, daß das monosubstituierte Hydrolyseprodukt Ala-(Cys)₂ bereits nach 30 Sekunden eine 5fach höhere Konzentration als (Ala-Cys)₂ aufwies.

Der Konzentrationsverlauf der freien Aminosäuren im Plasma ist ebenfalls in Abbildung 3 bzw. Abbildung 4 wiedergegeben. Nach Bolusinjektion von (Gly-Cys)₂ erfolgte eine sofortige Freisetzung von Cystin und Glycin. Der gegenüber dem Anfangswert ca. 5fach erhöhte Glycinspiegel verringerte sich im Untersuchungszeitraum nur geringfügig, während die

Konzentration an freiem Cystin langsam, aber stetig bis zum 10fachen Ausgangswert anstieg. Innerhalb 30 Sekunden nach Injektion von (Ala-Cys)₂ erreichten freies Alanin und Cystin ihre maximalen Konzentrationen, 7- bzw. 23fach höher als die entsprechenden Ausgangswerte. Während der Studie nahm die Konzentration an freiem Alanin deutlich ab, der Gehalt an freiem Cystin ging hingegen nur leicht zurück. In den bei einigen Tieren entnommenen Gewebeproben konnten weder cystinhaltige Peptide noch freies Cystin nachgewiesen werden.

Diskussion

Bereits im Jahre 1970 wurde erstmals darüber berichtet, daß das fetale Lebergewebe nur eine sehr geringe bzw. keine Cystathionase-Aktivität aufweist (35). Seit dieser Studie wird Cystin als unentbehrliche („semi-essentielle“) Aminosäure für Früh- und Neugeborene angesehen und sollte daher exogen zugeführt werden. Auch bei Patienten mit Leberzirrhose (9, 24, 25) sowie bei mangelernährten (8) und gesunden (29) Erwachsenen, die total parenteral ernährt werden, gilt Cystin mittlerweile als essentiell. Cystin ist jedoch in Wasser nahezu unlöslich und kann deshalb parenteralen Nährösungen nicht in ausreichenden Mengen zugeführt werden. In einer früheren Veröffentlichung haben wir erstmals die Synthese zweier cystinhaltiger Tripeptide mit C-terminalem Cystinrest und zwei Molekülen Alanin bzw. Glycin in den N-terminalen Positionen beschrieben (32). Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, erfüllen diese beiden Peptide alle chemischen/physikalischen Voraussetzungen für den Einsatz in parenteralen Nährösungen.

In einer vor kurzem veröffentlichten Humanstudie konnten wir zeigen, daß die Dipeptide Alanylglutamin und Glycyltyrosin bei Gesunden nach intravenöser Bolusinjektion sehr schnell hydrolysiert werden (5). Weder bei den Probanden noch bei Patienten mit Katabolie führte die Verabreichung dieser synthetischen Peptide zu irgendwelchen Nebenwirkungen oder Beschwerden (6, 12). Daher können beide Dipeptide als sichere und wirksame Substrate für die parenterale Ernährung betrachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vivo*-Verwertung von (Gly-Cys)₂ und (Ala-Cys)₂ nach Bolusinjektion bei der Ratte untersucht. Beide Peptide wurden schnell aus dem Plasma eliminiert, unmittelbar begleitet von einem Konzentrationsanstieg der freien Aminosäuren Glycin, Alanin und Cystin (Abb. 3 und 4). Zusätzlich zu den Aminosäuren konnte jeweils ein weiteres Abbauprodukt nachgewiesen werden, das einen ähnlichen Konzentrationsverlauf zeigte wie das injizierte (Gly-Cys)₂ bzw. (Ala-Cys)₂ (Abb. 3 und 4). Mit Hilfe von in unserem Labor synthetisierten Referenzsubstanzen konnten diese Produkte als die unsymmetrischen Disulfide Gly-(Cys)₂ bzw. Ala-(Cys)₂ identifiziert werden. Das Auftreten dieser Substanzen weist darauf hin, daß die Peptidelimation hauptsächlich auf eine sehr schnelle, in zwei Stufen ablaufende Hydrolyse zurückzuführen ist. Die Tatsache, daß nach der Injektion der Tripeptide innerhalb von 30 Sekunden große Mengen an monosubstituiertem Produkt gemessen werden konnten, deutet klar auf eine extrazelluläre Hydrolyse hin, vermutlich katalysiert durch lösliche und/oder Plasmamembran gebundene Peptidasen. Diese Annahme wird durch aktuelle Untersuchungen unterstützt, die

eine beträchtliche Hydrolaseaktivität im Plasma (3, 4, 21) sowie eine hepatische Dipeptidassimilation durch in den Plasmamembranen der Leber lokalisierte Enzyme (22) beschreiben. Auch die von Rennie et al. beschriebene Isolierung einer Dipeptidhydrolase aus der Plasmamembran des Skelettmuskels, die eine sehr hohe Affinität gegenüber Alanylglutamin aufweist (18), bestätigt die Hypothese einer extrazellulären Peptidspaltung. Unabhängig von der Diskussion, ob die Peptidhydrolyse hauptsächlich extra- oder intrazellulär stattfindet, beweisen laufende Studien eindeutig, daß menschliches Plasma eine beträchtliche Peptidhydrolyse-Aktivität gegenüber cystinhaltigen Peptiden aufweist (34).

Bei früheren Tierversuchen wurde die Wirksamkeit intravenös zugeführter Dipeptide üblicherweise anhand ihrer Eliminationshalbwertszeit aus dem Plasma beurteilt (1, 2, 4, 20, 22, 34). Aufgrund des sehr schnellen Verschwindens von $(\text{Gly-Cys})_2$ und $(\text{Ala-Cys})_2$ ist die Anwendung der dabei verwendeten kinetischen Modelle nicht sehr zweckmäßig. Obwohl 5 Proben innerhalb von 5 Minuten entnommen und nachfolgend mit einer hochempfindlichen HPLC-Methode analysiert wurden (Abb. 1 und 2), war es nicht möglich, eine für kinetische Auswertungen genügende Zahl an Proben mit detektierbaren Peptidkonzentrationen zu erhalten. Da die Elimination offensichtlich schneller verläuft als die Peptidverteilung im extrazellulären Kompartiment, sind exakte kinetische Berechnungen ausgeschlossen. Dennoch lässt sich aus den vorliegenden Daten schließen, daß das Glycylpeptid eine beträchtlich längere Eliminationshalbwertszeit aufweist (ca. 4 Minuten) als das Alanylpeptid (< 2 Minuten). Die sehr schnelle Elimination von $(\text{Ala-Cys})_2$ könnte den Vorteil haben, daß beträchtliche Mengen dieses Peptids zugeführt werden könnten, ohne daß es zu einer Akkumulation im Körper kommt. Das Risiko unerwünschter, bisher jedoch noch nicht beobachteter pharmakologischer und/oder physiologischer Nebenwirkungen kann somit auf ein Minimum reduziert werden. Interessanterweise zeigen $(\text{Ala-Cys})_2$ und $(\text{Gly-Cys})_2$ sowohl hinsichtlich der Art als auch des Ortes der Hydrolyse ein ähnliches Verhalten. Man kann daraus folgern, daß kurzkettige Peptide mit C-terminalem Cystinrest Substrate für extrazelluläre Peptidasen darstellen, unabhängig davon, ob Glycin oder Alanin die N-terminale Position einnehmen.

Interessanterweise lagen in allen Proben, die nach der Peptidinjektion entnommen wurden, die Plasmakonzentrationen von Cystin ca. 2fach über der Löslichkeit dieser Aminosäure in Wasser (0,1 g/l). Da es keine Anhaltspunkte dafür gab, die eine Bindung der cystinhaltigen Peptide oder von freiem Cystin an Plasmaproteine unterstützten, könnte diese unerwartete Beobachtung teilweise durch die erhöhte Körpertemperatur (37 °C) und durch die komplexe Zusammensetzung des Blutes (verbesserte Löslichkeit durch Salze) erklärt werden.

Die vorliegende tierexperimentelle Studie liefert den ersten Beweis, daß die Peptide $(\text{Gly-Cys})_2$ und $(\text{Ala-Cys})_2$ nach intravenöser Verabreichung im Organismus sehr schnell hydrolysiert werden, wobei die Spaltung vermutlich durch in Plasma lösliche und/oder an die Plasmamembran gebundene Peptidasen katalysiert wird. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, daß diese Peptide als potentielle Cystinquellen in der parenteralen Ernährung eingesetzt werden können. Unter Einbeziehung der bereits in Humanstudien eingesetzten Dipeptide Alanylglutamin und Glycyltyrosin

(5, 6) und eines der hier untersuchten cystinhaltigen Peptide scheint es somit erstmals möglich, ein „komplettes und ausgewogenes“ Aminosäure/Peptid-Präparat für die parenterale Ernährung bereitzustellen.

Literatur

1. Adibi SA (1987) Experimental basis for use of peptides as substrates for parenteral nutrition: a review. *Metabolism* 36:1001–1011
2. Adibi SA, Krzysik BA (1977) Effect of nephrectomy and enterectomy on plasma clearance of intravenously administered dipeptides in rat. *Clin Sci Mol Med* 52:205–213
3. Adibi SA, Morse EL (1982) Enrichment of glycine pool in plasma and tissue by glycine, di-, tri- and tetraglycine. *Am J Physiol* 243:413–417
4. Adibi SA, Paleos GA, Morse EL (1986) Influence of molecular structure on half-life and hydrolysis of dipeptides in plasma: importance of glycine as N-terminal amino acid residue. *Metabolism* 35:830–836
5. Albers S, Wernermaier J, Stehle P, Vinnars E, Fürst P (1988) Availability of amino acids supplied intravenously in healthy man as synthetic dipeptides. Kinetic evaluation of L-alanyl-L-glutamine and glycyl-L-tyrosine. *Clin Sci* 75:463–468
6. Albers S, Wernermaier J, Stehle P, Vinnars E, Fürst P (1989) Availability of amino acids supplied by constant intravenous infusion of synthetic dipeptides in healthy man. *Clin Sci* 76:643–648
7. Bergström J, Fürst P, Norree LO, Vinnars E (1974) The intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol* 36:693–697
8. Bonnetti G, Iapichino G, Radrizzani D, Scherini A, Malacrida R, Ronzoni G, Damia G (1988) Methionine, cystathionine and cystine increased urinary losses during total parenteral nutrition of adult patients. *Clin Nutr* 7:43–48
9. Chawla RK, Lewis FW, Kutner MH, Bate DM, Roy RGB, Rudman D (1984) Plasma cysteine, cystine and glutathione in cirrhosis. *Gastroenterology* 87:770–776
10. Cox CE, Beazley RM (1975) Chronic venous catheterization: A technique for implanting and maintaining venous catheters in rats. *J Surg Res* 104:330–332
11. Fürst P (1985) Peptides in parenteral nutrition. *Clin Nutr* 4 (spec suppl):105–115
12. Fürst P, Albers S, Stehle P, Pollack L, Mertes N, Puchstein C (1988) Parenteral use of L-alanyl-L-glutamine (Ala-Gln) and glycyl-L-tyrosine (Gly-Tyr) in post-operative patients. *Clin Nutr* 7 (spec suppl):41
13. Fürst P, Stehle P, Graser TA (1987) Fortschritte in der Aminosäure-Analytik unter besonderer Berücksichtigung der Ermittlung intrazellulärer Aminosäuremuster. *Infusionsther* 14:137–146
14. Gaull G, Sturman JA, Räihä NCR (1972) Development of mammalian sulfur metabolism: Absence of cystathionase in human fetal tissues. *Pediat Res* 6:538–547
15. Godel H, Graser TA, Földi P, Pfaender P, Fürst P (1984) Measurement of free amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 297:49–61
16. Graser TA, Godel H, Stehle P, Pfaender P, Fürst P (1984) Einsatz der HPLC zur Kontrolle der Peptidsynthese und nachfolgender Reinigungsschritte. In: Aigner H (Hrsg) Königsteiner Chromatographie-Tage. Waters, Eschborn, S 140–155
17. Graser TA, Godel HG, Albers S, Földi P, Fürst P (1985) An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. *Anal Biochem* 151:142–152
18. Hundal HS, Rennie M (1988) Skeletal muscle tissue contains extracellular aminopeptidase activity against Ala-Gln but no peptide transporter. *Europ J Clin Invest* 18 A34:163

19. Irwin MJ, Hegsted DM (1971) A conspectus of research on amino acid requirements of man. *J Nutr* 101:539-566
20. Karner J, Roth E, Karner-Hanusch J, Kovats E, Fürst P, Funovics J, Fritsch A (1987) Organspezifische in vivo-Dipeptidverwertung (Alanyl-glutamin, Glyzyl-glutamin) beim katabolen Hund. *Contr Infusion Ther Clin Nutr* 17:137-143
21. Krzysik BA, Adibi SA (1979) Comparison of metabolism of glycine injected intravenously in free and dipeptide form. *Metabolism* 28:1211-1217
22. Lochs M, Morse EL, Adibi SA (1986) Mechanism of hepatic assimilation of dipeptides. Transport vs. hydrolysis. *J Biol Chem* 261:14976-14981
23. Pohlandt F (1974) Cystine: A semi-essential amino acid in the newborn infant. *Acta Paediatr Scand* 63:801-804
24. Rudman D, Chawla RK, Bleier JC (1983) Cystine and tyrosine requirements during the nutritional depletion of cirrhotic patients. In: Blackburn GL, Grant JP, Young VR (eds) *Amino acids: metabolism and medical applications*. John Wright, Boston Bristol London, pp 484-496
25. Rudman D, Kutner M, Ansley J, Jansen R, Chipponi J, Bain RP (1981) Hypotyrosinemia, hypocystinemia and failure to retain nitrogen during total parenteral nutrition of cirrhotic patients. *Gastroenterology* 81:1025-1035
26. Snyderman SE (1975) Recommendations for parenteral amino acid requirements. In: Winters RW, Hasselmeyer EG (eds) *Intravenous nutrition in the high risk infant*. John Wiley, New York, p 422
27. Stegink LD, Baker GL (1971) Infusion of protein hydrolysates in the newborn infant: Plasma amino acid concentrations. *J Pediat* 78:595-603
28. Stegink LD (1975) Amino acid metabolism. In: Winters RW, Hasselmeyer EG (eds) *Intravenous nutrition in the high-risk infant*. John Wiley, New York, pp 181-203
29. Stegink L, DenBesten L (1972) Synthesis of cystine from methionine in normal adult subjects. Effect of route of alimentation. *Science* 178:514-516
30. Stehle P, Bahsittia HP, Fürst P (1986) Analytical control of enzyme-catalyzed peptide synthesis using capillary isotachophoresis. *J Chromatogr* 370:131-138
31. Stehle P, Kühne B, Kubin W, Fürst P, Pfaender P (1982) Synthesis and characterization of tyrosine- and glutamine-containing peptides. *J Appl Biochem* 4:280-286
32. Stehle P (1988) Bedarfsgerechte Bereitstellung von kurzkettigen Peptiden - eine Voraussetzung für deren Einsatz in der künstlichen Ernährung. *Infusionsther* 15:27-32
33. Stehle P, Fürst P (1985) Isotachophoretic control of peptide synthesis and purification. A novel approach using ultraviolet detection at 206 nm. *J Chromatogr* 346:271-279
34. Stehle P, Bohlmann F, Fürst P (1988) Peptide hydrolase activity of human plasma. In vitro cleavage of glutamine-, tyrosine- and cystine-containing short chain peptides. *Clin Nutr* 7 (spec suppl):40
35. Sturman JA, Gaull G, Räihä NCR (1970) Absence of cystathionase in human fetal liver. Is cystine essential? *Science* 169:74-75
36. Tapuhi Y, Schmidt DE, Lindner W, Karger BL (1981) Dansylation of amino acids for high-performance liquid chromatography analysis. *Anal Biochem* 115:123-129
37. Zlotkin SH, Bryan MA, Anderson GH (1981) Cystine supplementation of cystine-free intravenous feeding regimens in newborn infants. *Am J Clin Nutr* 34:914-923

Eingegangen 24. Februar 1989

Für die Verfasser:

Prof. Dr. P. Fürst, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, 7000 Stuttgart 70