

In-vitro-Experimente zur bakteriziden Wirkung von N-Chlortaurin¹

M. Nagl und W. Gottardi*

Einleitung

Werden menschliche Granulozyten und Makrophagen stimuliert (z. B. mit Phorbolmyristylacetat oder opsonierten Zymosanpartikeln), produzieren sie aus Wasserstoffperoxid und Chlorid mit Hilfe der Myeloperoxidase Hypochlorit (HOCl) (1, 2). Diese Substanz wirkt stark oxidierend und daher auch bakterizid, besitzt aber infolge ihrer hohen Reaktionsfreudigkeit nur eine sehr geringe Stabilität. So reagiert Hypochlorit augenblicklich sowohl mit bakteriellen als auch körpereigenen Molekülen, die oxidierbare Gruppen (z. B. R-NH₂, R-SH) aufweisen (2, 3, 4).

Hierbei entstehen u. a. Chloramine der allgemeinen Formel R-NHCl (R = H, Alkyl- bzw. Aminosäurerest), die im Überstand von stimulierten Phagozyten nachgewiesen werden konnten (5, 6, 7, 8). Diese Chloramine wirken ebenfalls bakterizid, sind aber weniger reaktiv und daher in Gegenwart von biologischen Substraten wesentlich stabiler (in vitro über mehrere Stunden) als HOCl (6). Sie spielen vermutlich eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen, indem sie einerseits am Abtöten von Bakterien beteiligt sein sollen, z. B. NH₂Cl (5, 9), andererseits aber infolge ihrer geringeren Reaktivität die körpereigenen Zellen weniger schädigen als HOCl (5, 9). Da die Aminosäure Taurin in Leukozyten in verhältnismäßig hoher Konzentration vorliegt (20–50 mmol/l [10, 11, 12]), ist sie ein wichtiger Reaktionspartner für Hypochlorit:



Als Reaktionsprodukt entsteht N-Chlortaurin (NCT), welches einen Hauptbestandteil der von Phagozyten gebildeten Chloramine darstellt (5, 6). Seine Funktion konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Es gibt Hinweise, daß NCT am Abtöten von *Escherichia coli* durch Leukozyten beteiligt sein könnte (9). Gegenüber *Schistosoma mansoni* hingegen wurde eine vermizide Wirkung von NCT in vitro bereits bewiesen (13). Andererseits wird seine bakterientötende Funktion zum Teil negiert und der NCT-Bildung nur eine Schutzfunktion der körpereigenen Zelle vor HOCl zugeschrieben (5). Angesichts dieser divergierenden Ansichten war es von Interesse, inwiefern NCT, das in Form des kristallinen Natriumsalzes

In-vitro Experiments on the Bactericidal Action of N-chloro Taurine¹

M. Nagl und W. Gottardi*

Introduction

When stimulated by, for instance, phorbol myristacetate or opsonised zymosan particles, human granulocytes and macrophages will produce hypochlorite (HOCl) from hydrogen peroxide and chloride with the aid of myeloperoxidase (1, 2). While this substance is a powerful oxidant and does, consequently, have a bactericidal effect, it is so highly reactive that its stability is very low. Thus, hypochlorite will react immediately with all bacterial as well as endogenous cell molecules that feature oxidisable groups (e.g. R-NH₂, R-SH) (2, 3, 4).

Among other substances, this process produces chloramines with the global formula R-NHCl (R = H, alkyl and/or amino acid residue) whose presence has been demonstrated in the supernatant of stimulated phagocytes (5, 6, 7, 8). While these chloramines do have a bactericidal effect, they are less reactive and, consequently, much more stable (several hours in vitro) in the presence of biological substrates than HOCl (6). They probably play an important role in inflammatory reactions, for it is believed that they contribute towards the elimination of bacteria, e. g. NH₂Cl (5, 9), while being less harmful than HOCl to endogenous cells because of their lesser reactivity (5, 9). Since taurine, an amino acid, is present at relatively high concentration in leucocytes (20–50 mmol/l [10, 11, 12]) it is one of hypochlorite's major reactants:



The product of this reaction is N-chlorotaurine (NCT), one of the more important compounds among the chloramines formed by phagocytes (5, 6). So far, the precise function of NCT has not been thoroughly clarified. There are indications suggesting that NCT might play a role in the destruction of *Escherichia coli* by leucocytes (9). Furthermore, it has been confirmed in vitro that NCT does have a vermizidal effect on *Schistosoma mansoni* (13). Conversely, there are those who deny any bactericidal effect, maintaining that the sole purpose of NCT is to protect endogenous cells from HOCl (5). In view of this controversy it appeared interesting to investigate the true extent of the in-vitro bactericidal effect of NCT in its crystalline sodium salt form (14) on a number of major pathogens.

Dr. M. Nagl, Univ.-Doz. Dr. Waldemar Gottardi, Institut für Hygiene, Universität Innsbruck, Fritz-Pregl-Straße 3, A-6010 Innsbruck

¹ Vortrag anlässlich der 23. Jahrestagung der ÖGHMP in Villach, Österreich, 19. bis 21. Mai 1992

¹ Paper presented at the 23rd Annual Conference of the ÖGHMP in Villach, Austria, May 19th to 21st, 1992

(14) zur Verfügung stand, in vitro eine bakterizide Wirkung gegenüber wichtigen Krankheitserregern aufweist. Weiters sollten Messungen der Stabilität von NCT darüber Aufschluß geben, welche Rolle NCT für die Stabilität der Gesamtheit der von Phagozyten produzierten Chloramine zukommen könnte.

Materialien und Methoden

Reagenzien

N-Chlortaurin-Natrium (MG = 181.64) wurde nach (14), HOCl durch Destillation von Hypochloritlösungen hergestellt. Chloramin-T sowie alle Puffersubstanzen stammten von der Firma Merck (Reinheitsgrad p. A.), Taurin (reinst) von der Firma Serva. Die Konzentration der Puffer betrug durchwegs 0,05 M/l. Hierbei wurde Phosphat für die pH-Werte 6,0, 7,0, 11,0 und 12,0, Citrat für 4,0, 5,0 und 6,0, Kaliumhydrogenphthalat für 4,0 und 5,0, Natriumborat für 8,0 und 9,0 bzw. Natriumcarbonat für 10,0 verwendet. Der Gehalt der gepufferten NCT- und HOCl-Lösungen wurde jeweils vor den Tests iodometrisch überprüft.

Testkeime

Als Testkeime dienten *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Bacillus subtilis* (Fa. Merck, BGA) sowie *Candida albicans* (ATCC 10231).

Ermittlung der bakteriziden Wirkung

Es gelangten der qualitative und der quantitative Suspensionsversuch entsprechend den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) (15, 16) zur Anwendung: 0,1 ml einer Kultur des jeweiligen Testkeimes in 3% CSL ($1,5 \times 10^8 - 2,1 \times 10^9$ KBE/ml; $1,0 - 1,5 \times 10^7$ KBE/ml bei *Candida albicans*) wurden mit 10 ml der gepufferten NCT-Lösung (0,1 - 55 mmol/l = 0,00182 - 1,0%) vermischt und nach unterschiedlich langer Einwirkungszeit (15 sec bis zu 159 h) je 0,1 ml aus diesem Gemisch auf 8 ml CSL (3%) überimpft (qualitativer Suspensionsversuch) bzw. nach geeigneter Verdünnung mit 0,9% NaCl auf CSA-Platten verteilt (quantitativer Suspensionsversuch, drei CSA-Platten pro Verdünnung und Einwirkungszeit). Zur Inaktivierung von NCT enthielt die Verdünnungslösung 0,5% Natriumthiosulfat. Beim qualitativen Suspensionsversuch wurde auf Inaktivierungssubstanzen verzichtet, da die hierbei stattfindende 1 : 80-Verdünnung mit 3% CSL (kombiniert mit der zehrenden Wirkung) selbst bei der höchsten Konzentration von NCT (1%) zur Desaktivierung genügte. Die Kontrollen wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt, wobei statt NCT die jeweils äquimolare Menge Taurin zum Einsatz kam. Nach 24- bis 72stündigem Bebrüten der beimpften CSL-Röhrchen bzw. CSA-Platten bei 37 °C erfolgte die Auswertung.

Qualitativer Suspensionsversuch

Aus den Einwirkungszeiten des letzten getrübbten (t_n) und ersten klaren d. h. sterilen CSL-Röhrchens (t_{n+1}) wurde mit $t_{\text{Abt.}} = (t_n + t_{n+1})/2$ die Abtötungszeit unter den gegebenen Bedingungen (Konzentration, pH-Wert) gefunden,

Beyond this, it was envisaged to conduct stability tests to show what role NCT could possibly play in assuring the stability of the chloramines produced by phagocytes.

Material and Methods

Reagents

N-chlorotaurine sodium (MG = 181.64) was prepared in accordance with (14), while HOCl was prepared by distilling hypochlorite solution. Both chloramine-T as well as all buffer substances were procured from Merck (reagent grade), while taurine (superpure) was procured from Serva. The concentration of buffers was 0.05 M/l throughout, phosphate being used for pH values 6.0, 7.0, 11.0, and 12.0; citrate for 4.0, 5.0, and 6.0; potassium hydrogen phthalate for 4.0 and 5.0; sodium borate for 8.0 and 9.0; and sodium carbonate for 10.0. The concentration of the buffered NCT and HOCl solutions was checked by iodometry before each test.

Test Pathogens

Test pathogens included *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Bacillus subtilis* (Merck, FHO), and *Candida albicans* (ATCC 10231).

Demonstration of Bactericidal Effects

Both the qualitative and the quantitative variant of the suspension test as defined in the directives of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM), (15), (16) were applied: 0.1 ml of a 3% CSL test pathogen culture ($1.5 \times 10^8 - 2.1 \times 10^9$ CFU/ml; $1.0 - 1.5 \times 10^7$ CFU/ml of *Candida albicans*) were mixed with 10 ml of buffered NCT solution (0.1 - 55 mmol/l = 0.00182 - 1.0%) and left to stand for various lengths of time (between 15 s and 159 h), after which 8 ml of 3% CSL were inoculated with 0.1 ml of the mixture (qualitative suspension test); alternatively, the same aliquot, after dilution with 0.9% NaCl, was spread on CSA plates (quantitative suspension test; 3 CSA plates per dilution grade and exposure time length). The dilutants contained 0.5% sodium thiosulfate to deactivate the NCT. No deactivators were used in the qualitative suspension tests since the degree of deactivation achieved by the 1 : 80 dilution with 3% CSL together with the accompanying attenuation effect was deemed adequate even at maximum NCT concentrations (1%). Control tests were conducted under identical conditions, an equimolar quantity of taurine being used in each instance instead of NCT.

Samples were evaluated after the inoculated CSL tubes or CSA plates had been incubated for between 24 and 72 h at 37 °C.

Qualitative Suspension Test

Under each set of conditions (concentration, pH value) a destruction interval was computed by the formula $t_{\text{dest.}} = (t_n + t_{n+1})/2$ from the exposure times of the last turbid (t_n) and the first clear or sterile CSL tube (t_{n+1}) which, however, includes an error factor of $f_{t(\text{dest.})} = (t_{n+1} - t_n)/2$.

Whenever repeat tests had been conducted, an average destruction interval was computed by $\bar{t}_{\text{dest.}} = \frac{1}{2} \sum t_{\text{dest.}}$ and

die mit einem Fehler von $f_{i(Abt.)} = (t_{n+1} - t_n)/2$ behaftet ist. Bei Vorliegen von Wiederholmessungen wurde die mittlere Abtötungszeit mit $t_{Abt.} = \frac{1}{2} \sum t_{Abt.}$, und aus der Spanne $R = t_{n+1(max)} - t_{n(min)}$ ein Schätzwert \hat{s} für die Standardabweichung nach $\hat{s} = (\sum R^2/2n')^{1/2}$ (17) berechnet (n' = Anzahl der Wiederholmessungen).

Quantitativer Suspensionsversuch

Die Reduktionsfaktoren wurden berechnet nach $Rf_i = \log KBE (Ko) - \log KBE (NCT)$
 $KBE (Ko) =$ Anzahl der KBE/ml ohne Einwirkung von NCT
 $KBE (NCT) =$ Anzahl der KBE/ml nach Einwirkung von NCT

Messung der Stabilität von N-Chlortaurin

Dazu wurde NCT allein und mit 0,03% CSL in 0,05 molarem Phosphatpuffer (pH 7,0) bzw. in 3% CSL (pH 7,5 bis 7,8) gelöst unter Lichtausschluß bei Zimmertemperatur (20 °C) bzw. im Brutschrank (37 °C) aufbewahrt. Als Maß für die Stabilität diente die Oxidationskapazität von NCT, ermittelt durch iodometrische Titration.

Ergebnisse

Bakterizide Wirkung von NCT

Abbildung 1 zeigt in Abhängigkeit vom pH-Wert die Einwirkungszeit von 1% NCT (55 mmol/l), die nötig ist, um ca. 10^7 KBE/ml des jeweiligen Testkeimes (ca. 10^5 KBE/ml bei *Candida albicans*) abzutöten. Bei pH 7,0 waren die Subkulturen nach ca. 36 min steril, bei *Candida albicans*

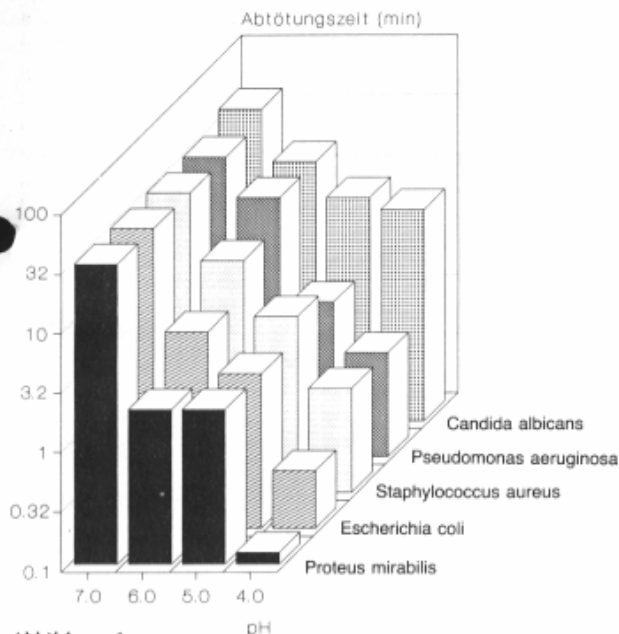


Abbildung 1: Bakterizide Wirkung von 1% NCT (55 mmol/l) gegenüber verschiedenen Keimen bei pH 4,0–7,0 (qualitativer Suspensionsversuch; $1,5 \times 10^5 - 2,1 \times 10^7$ KBE/ml, $1,0 - 1,5 \times 10^5$ KBE/ml bei *Candida albicans*).

Figure 1: Bactericidal effect of 1% NCT (55 mmol/l) on a variety of germs at pH 4.0–7.0 (qualitative suspension test; $1,5 \times 10^5 - 2,1 \times 10^7$ CFU/ml, $1,0 - 1,5 \times 10^5$ CFU/ml of *Candida albicans*).

an estimated standard deviation by $\hat{s} = (\sum R^2/2n')^{1/2}$ (17) from the range $R = t_{n+1(max)} - t_{n(min)}$ (n' = number of repeat tests).

Quantitative Suspension Test

Reduction factors were computed by $Rf_i = \log CFU (Ko) - \log CFU (NCT)$, CFU (Ko) being the number of CFUs/ml without NCT exposure, and CFU (NCT) being the number of CFUs/ml after exposure to NCT.

N-chlorotaurine Stability Measurements

NCT was dissolved both on its own and with an admixture of 0.03% CSL in a 0.05-mol phosphate buffer (pH 7.0) and in a 3% CSL solution (pH 7.5–7.8) and kept in the dark either at room temperature (20 °C) or in an incubation cabinet (37 °C). Stability was judged by the residual oxidation capacity of NCT as measured by iodometric titration.

Results

Bactericidal Effect of NCT

Figure 1 shows a range of pH values versus the exposure time required by a 1% NCT solution (55 mmol/l) to destroy approximately 10^7 CFU/ml of a test pathogen (approximately 10^5 CFU/ml *Candida albicans*). At pH 7.0, subcultures were sterilised within approximately 36 min (approximately 45 min in *Candida albicans*). With increasing acidity of the environment, requisite exposure times declined in all test series, going below 1 min at pH 4 (approximately 6 min in *Candida albicans*). These

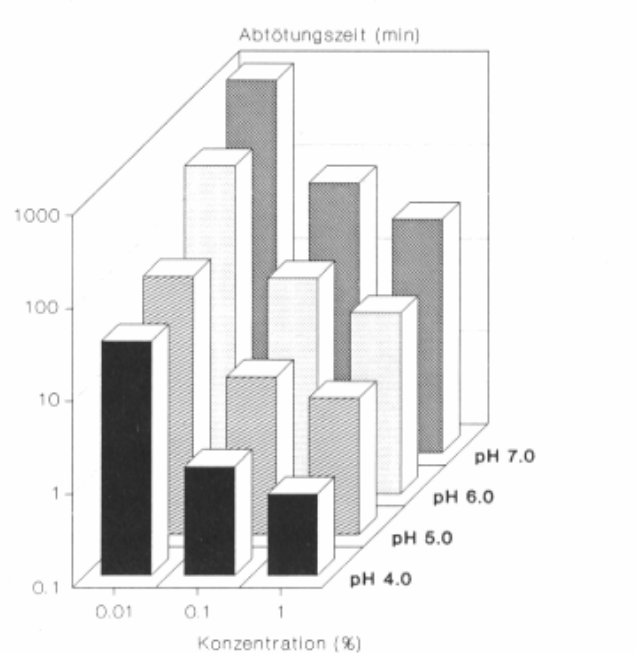


Abbildung 2: Bakterizide Wirkung von 0,01, 0,1 und 1,0% NCT (0,55–55 mmol/l) gegenüber *Staphylococcus aureus* bei pH 4,0–7,0 (qualitativer Suspensionsversuch; $3,0 \times 10^6 - 1,0 \times 10^7$ KBE/ml)

Figure 2: Bactericidal effect of 0.01, 0.1, and 1.0% of NCT (0.55–55 mmol/l) on *Staphylococcus aureus* at pH 4.0–7.0 (qualitative suspension test; $3,0 \times 10^6 - 1,0 \times 10^7$ CFU/ml).

Tabelle 1:
Ergebnisse des qualitativen Suspensionsversuchs¹ mit 1% NCT (55 mmol/l) bei pH 8–12
Table: 1
Results of qualitative suspension tests¹ involving 1% NCT solutions (55 mmol/l) at pH 8–12

Keim/Pathogen	pH	Abtötungszeit/Destruction time (min)	
		1% NCT	Kontrolle/ Control test
S. aureus	8	20 ± 10	
	9	75 ± 15	
	10	105 ± 15	>300
	11	180 ± 30	
	12	45 ± 15	105 ± 15
E. coli	8	20 ± 10	
	9	20 ± 10	>300
	10	20 ± 10	
	11	105 ± 15	225 ± 15
	12	<10	<60

¹ Keimzahl/Germ count: $5.7 \times 10^6 - 1.4 \times 10^7$ KBE/ml (CFU/ml)

nach ca. 45 min. Im zunehmend sauren Milieu nahmen die Abtötungszeiten durchwegs ab und betrugen bei pH 4 weniger als 1 min, bei *Candida albicans* ca. 6 min. Aus diesen Ergebnissen kann eine durchschnittliche Verkürzung der Abtötungszeit auf ein Drittel (die Hälfte bei *Candida albicans*) bei einer pH-Senkung um eine Einheit abgeleitet werden.

Wie Versuche mit *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* zeigten, ist dieser pH-Effekt auch im alkalischen Bereich festzustellen (Zunahme der Einwirkungszeiten bei pH-Steigerung, Tab. 1). Bei pH 12 nahmen die Abtötungszeiten jedoch wieder ab, was auf das alkalische Milieu zurückzuführen ist (siehe Kontrollen).

Da aufgrund bisheriger Ergebnisse stimulierte Phagozyten (ca. 10^6 /ml) etwa 0,1 mmol/l Chloramine produzieren (5, 6), ist eine Konzentration von 55 mmol/l NCT sicherlich unphysiologisch. Eine Verringerung der Konzentration bis in den (möglicherweise lokal in vivo erreichten) mikromolaren Bereich zeigte ebenfalls eine – wiederum vom pH-Wert beeinflusste – bakterizide Wirkung (Tab. 2):

0,01% NCT (0,55 mmol/l) tötete bei pH 7,0 10^7 KBE/ml von *Proteus mirabilis* innerhalb von 6 h, von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* innerhalb von 24 h und von *Pseudomonas aeruginosa* nur in einem von drei Experimenten innerhalb von 24 h ab. Bei pH 5,0 hingegen trat dieser Effekt bei allen vier Testbakterien spätestens nach 7 h ein. *Candida albicans* ließ sich bei beiden pH-Werten in diesem Konzentrationsbereich nicht mehr vollständig abtöten.

Gegenüber *Staphylococcus aureus* wurde der gesamte pH-Bereich von 4,0 bis 7,0 bei drei verschiedenen NCT-Konzentrationen geprüft (Abb. 2). Es ist zu erkennen, daß eine entsprechende pH-Senkung die schwächere Wirkung einer geringeren Konzentration zum Teil kompensiert. Das saure Milieu allein vernichtete die Keime nicht – die Kontrollen zeigten volles Wachstum der Bakterien bei allen getesteten pH-Werten.

Da die notwendigen Einwirkungszeiten im mikromolaren Bereich sehr lange und die qualitativ ermittelten Ergeb-

Tabelle 2:
Ergebnisse des qualitativen Suspensionsversuchs¹ mit 0,01% NCT (550 µmol/l) bei pH 5,0 und pH 7,0
Table: 2
Results of qualitative suspension tests¹ involving 0,01% solutions of NCT (550 µmol/l) at pH 5.0 and 7.0

Keim/Pathogen	Abtötungszeit/Destruction time (h)			
	pH 5.0	n ²	pH 7.0	n
S. aureus	0.9	1	15.7 ± 7.3	3
	<1.5	1		
	>0.9	1		
E. coli	2.7 ± 1.5	3	13.4 ± 6.8	3
Proteus mirabilis	1.2 ± 0.7	2	3.8 ± 1.1	3
	<0.8	1		
Pseudomonas aeruginosa	5.2 ± 2.0	2	15.3 ± 7.8	1
	<0.8	1	>23	2

¹ Keimzahl/Germ count: $3.7 \times 10^6 - 1.5 \times 10^7$ KBE/ml (CFU/ml)

² Anzahl der Wiederholungsmessungen/Number of repeat tests

results indicate that lowering the pH value by 1 unit will shorten the average time of destruction by two thirds (one half in *Candida albicans*).

Tests involving *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* showed that this effect of the pH value is evident in alkaline environments as well (longer exposure periods at higher pH values, Table 1). At pH 12, however, exposure periods began to decline again because of the alkalinity of the environment (see control tests).

Since previous findings indicate that stimulated phagocytes (approx. 10^6 /ml) will produce approximately 0.1 mmol/l of chloramine (5, 6) NCT concentrations of 55 mmol surely cannot be regarded as physiological. Lower concentrations down to the micromolar range (which may locally be possible in vivo) also had a bactericidal effect which, however, again depended on the pH value (Table 2) as follows:

At pH 7.0, 0.01% of NCT (0.55 mmol/l) destroyed 10^7 CFU/ml of *Proteus mirabilis* within 6 h; *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were similarly destroyed within 24 h, while *Pseudomonas aeruginosa* showed that effect within 24 h only in one of three experiments. At pH 5.0, however, all four test bacteria showed the same effect within no more than 7 h. *Candida albicans* could not be completely eliminated at either pH value within this concentration range.

Staphylococcus aureus was tested across the entire pH range between 4.0 and 7.0 at three different NCT concentrations (Fig. 2). The diagram shows that lower pH values will partially make up for the loss of bactericidal effect induced by lower concentrations. It was not the acid environment alone that destroyed the bacteria, for as the control tests showed, they flourish at all pH values tested.

Since in the micro-molar range exposure times grow extremely long, and qualitative results grow increasingly unreliable in consequence, NCT was tested in a concentration of 0.1 mmol/l in quantitative suspension tests (germ count $6 \times 10^4 - 2.6 \times 10^5$; $3.6 - 5.6 \times 10^4$ of *Candida albicans*). The factors by which germ counts were reduced after 1 h, 6 h, 13.5 h, and 21 h of exposure at pH 7.0 are listed in Table 3. After 6 h, only *Proteus*

nisse daher zunehmend ungenauer werden, wurde NCT in der Konzentration von 0,1 mmol/l auch im quantitativen Suspensionsversuch (Keimzahl $6 \times 10^4 - 2,6 \times 10^5$; $3,6 - 5,6 \times 10^4$ bei *Candida albicans*) getestet. Die Keimreduktionswerte nach 1 h, 6 h, 13,5 h und 21 h Einwirkungszeit bei pH 7,0 sind in Tabelle 3 aufgelistet. Nach 6 h wurde nur die Zahl der KBE von *Proteus mirabilis* stark reduziert. Bei *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* waren dafür 13–21 h nötig, mehr als 21 h bei *Pseudomonas aeruginosa*. Bei *Candida albicans* zeigte sich nach dieser Einwirkungszeit hingegen nur eine minimale Keimreduktion. Dieser Hefepilz erwies sich auch bei pH 5,0 als ähnlich resistent – ganz im Gegensatz zu den übrigen Keimen. So sank bei *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* die Zahl der KBE bei pH 5,0 schon nach 1 h um mehr als drei Zehnerpotenzen, bei *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* nach 6 h Einwirkungszeit (siehe Tab. 4).

Um das Verhalten von Sporenbildnern zu prüfen, wurde die 1%ige NCT-Lösung bei pH 7,0 mit Sporen bzw. Vegetativformen von *Bacillus subtilis* beimpft (ca. 10^3 KBE/ml). Während bei den Sporen auch nach einer Woche keine Keimreduktion (auch bei pH 4,0) nachweisbar war, starben die Vegetativformen schon nach 10 min zu mindestens 99% ab, sind also ähnlich empfindlich wie die Nichtsporenbildner.

Stabilität von N-Chlortaurin

Wie Abbildung 3 zeigt, ist in wäßriger Lösung bei pH 7,0 von der anfänglichen Oxidationskapazität nach einer Woche bei 20 °C (37 °C) noch ca. 90% (25%) vorhanden (vgl. 6), wobei – wie zu erwarten – die Abbaugeschwindigkeit mit der Temperatur zunimmt. NCT ist jedenfalls im Vergleich zu N-Chlor- α -Aminosäuren (18, 19) als sehr stabil zu bezeichnen. Der Einfluß von Proteinen auf die Stabilität von NCT wurde in Gegenwart von 0,03% CSL und 3% CSL bei 20 °C geprüft (Abb. 4). Hierbei sinkt die Oxidationskapazität schneller, abhängig von der CSL-Konzentration, da NCT offenbar mit den Proteinbestandteilen der CSL reagiert. Allerdings dauerte es auch in Gegenwart von 3% Proteinzusatz länger als 24 Stunden, bis kein aktives Chlor mehr nachweisbar war.

Tabelle 3:
Reduktionsfaktoren nach 1–21 h Einwirkung von 100 μ mol/l NCT (0,00182%) auf verschiedene Keime¹ bei pH 7,0
Table: 3
Factors of reduction of various germs¹ after 1–21 h exposure to 100 μ mol/l of NCT (0.00182%) at pH 7.0

Keim/Pathogen	Einwirkungszeit/Exposure time			
	1 h	6 h	13.5 h	21 h
<i>S. aureus</i>	0	0	0.8	2.7
<i>E. coli</i>	0	0.6	2.5	>3.5
<i>Proteus mirabilis</i>	0.6	>2.3	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0.5	0.6	1.1
<i>Candida albicans</i>	0	0.1	0.7	0.7

¹ Keimzahl/Germ count: $3.6 \times 10^4 - 5.0 \times 10^5$ KBE/ml (CFU/ml)

mirabilis showed a considerable decline in the number of CFUs. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* took between 13 and 21 h, while *Pseudomonas aeruginosa* took more than 21 h. *Candida albicans* germ counts declined only minimally after exposure. At pH 5.0, this yeast fungus proved similarly robust – quite unlike the other germs. Thus, the CFU count of both *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* declined by more than three powers of ten after 1 h at pH 5.0, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* reaching the same level after 6 h of exposure (see Table 4).

To test the responses of spore-forming organisms, a solution containing 1% of NCT at pH 7.0 was inoculated with spores and/or vegetative forms of *Bacillus subtilis* (approximately 10^3 CFU/ml). While no reduction was found in the spore counts even after one week of exposure (even at pH 4.0), 99% or more of the vegetative bacterial forms were destroyed after a mere 10 min, demonstrating that they are similarly sensitive as the other organisms.

Stability of N-chlorotaurine

As Figure 3 shows, the residual oxidation capacity of NCT in an aqueous solution at pH 7.0 amounts to approximately 90% (25%) after one week's storage at 20 °C (37 °C) (cf. 6), with the rate of degradation predictably increasing with the temperature. Nevertheless, NCT is extremely stable compared to N-chloro- α -amino acids (18, 19). The extent to which the stability of NCT is influenced by proteins was tested both in 0.03% and 3% CSL solutions at a temperature of 20 °C (Fig. 4). In this instance, oxidation capacity declines faster at a rate dependent on the concentration of CSL, obviously because NCT reacts with the CSL protein components. However, even at a protein concentration of 3%, it took more than 24 hours for all traces of active chlorine to disappear.

Discussion

Effect of N-chlorotaurine on Bacteria

The results of this study as shown in Figs. 1–2 and Tables 1–4 constitute proof positive that NCT does indeed have a bactericidal effect. Predictably, this effect is concentration-related, but it is surprising that it is also extremely

Tabelle 4:
Reduktionsfaktoren nach Einwirkung (1 und 6 h) von 100 μ mol/l NCT (0,00182%) auf verschiedene Keime¹ bei pH 5,0
Table 4:
Factors of reduction of various germs¹ after 1 and 6 h exposure to 100 μ mol/l of NCT (0.00182%) at pH 5.0

Keim/Pathogen	Einwirkungszeit/Exposure time	
	1 h	6 h
<i>S. aureus</i>	1.2	>2.8
<i>E. coli</i>	1.7	3.6
<i>Proteus mirabilis</i>	>3.4	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.3	–
<i>Candida albicans</i>	0.1	0.2

¹ Keimzahl/Germ count: $5.6 \times 10^4 - 2.6 \times 10^5$ KBE/ml (CFU/ml)

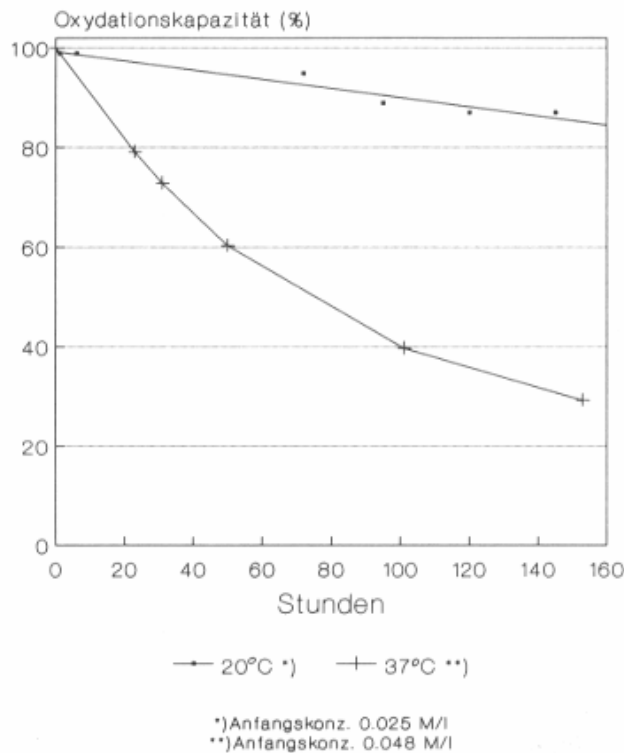


Abbildung 3:
Stabilität von NCT in wäßriger Lösung bei 20 °C bzw. 37 °C und pH 7,0.

Figure 3:
Stability of NCT in aqueous solution at 20 °C and 37 °C, pH 7.0.

Diskussion

Wirkung von N-Chlortaurin auf Bakterien

Mit den vorliegenden, in den Abbildungen 1–2 und den Tabellen 1–4 zusammengefaßten Ergebnissen konnte eindeutig bewiesen werden, daß NCT bakterizid wirkt. Neben einer – zu erwartenden – Konzentrationsabhängigkeit zeigte sich als überraschendes Phänomen die starke pH-Abhängigkeit, die sich in einer drastischen Verkürzung der Abtötungszeiten bei einer pH-Senkung manifestiert. Für diesen pH-Effekt können zumindest zwei Ursachen verantwortlich sein:

- Eine pH-bedingte Veränderung der Chlorkomponente aufgrund von Solvolyse-, Dissoziations- und Disproportionierungsreaktionen, wie sie z. B. bei Hypochlorit und Chloramin-T auftreten und zu einer Veränderung der Chlorierungspotenz und auch bakteriziden Wirkung führen (20, 21). Nach den bisherigen Kenntnissen tritt bei NCT lediglich eine Disproportionierung unter Bildung von N,N-Dichlortaurin ($2 \text{ R-NHCl} \rightarrow \text{R-NH}_2 + \text{R-NCl}_2$) ein, während die Solvolyse unter Bildung von Hypochlorit ($\text{R-NHCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-NH}_2 + \text{HOCl}$) in Analogie zu den Verhältnissen bei NH_2Cl (22) vernachlässigt werden kann. Die Dissoziation unter Bildung des Dianions $\text{Cl-N}^-\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$ konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (14). Da die Disproportionierung unter Bildung von N,N-Dichlortaurin erst im sauren Milieu $< \text{pH } 5$ mit endlicher Geschwindigkeit abläuft (14, 19, 23), der beobachtete pH-Effekt

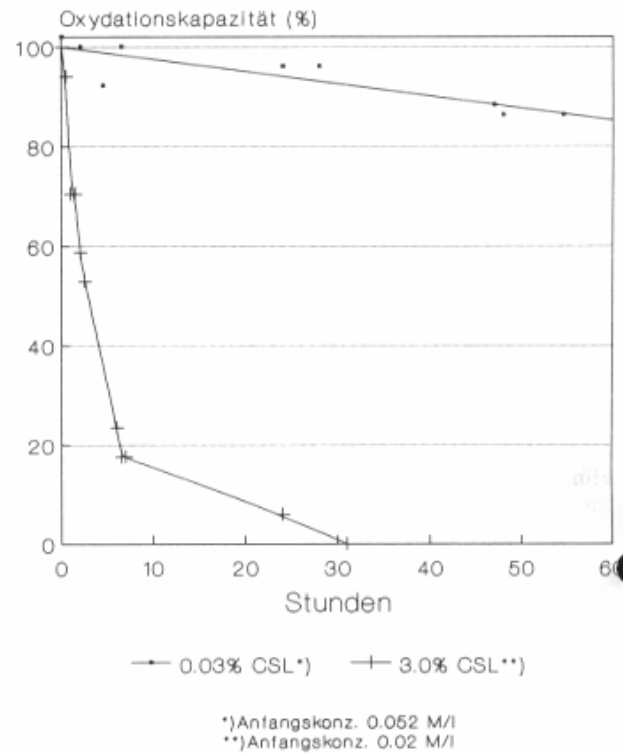


Abbildung 4:
Stabilität von NCT in Gegenwart von 0,03% CSL (pH 7,0) und in 3%-CSL-Lösung (pH 7,5–7,8) bei 20 °C.

Figure 4:
Stability of NCT in solutions containing 0.03% of CSL (pH 7.0) and 3% of CSL (pH 7.5–7.8) at 20 °C.

pH-dependent, as demonstrated by the fact that exposure times decline drastically at lower pH values. The following two causes may – among others – be responsible for this effect:

- The chlorine component may undergo pH-related changes effected by solvolysis, dissociation, or disproportionation reactions like those occurring, for instance, between hypochlorite and chloramine-T which affect both the chlorination potential and the bactericidal effect (20, 21). What information is available suggests that NCT is merely subject to disproportionation involving the formation of N,N-dichlorotaurine ($2 \text{ R-NHCl} \rightarrow \text{R-NH}_2 + \text{R-NCl}_2$) while solvolysis, which forms hypochlorite ($\text{R-NHCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-NH}_2 + \text{HOCl}$) is negligible, as is suggested by the similar case of NH_2Cl (22). Attempts to establish dissociation reactions, which would form $\text{Cl-N}^-\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$, have also been unsuccessful (14). Since the speed of the disproportionation reaction and the formation of N,N-dichlorotaurine becomes finite only in acid environments of pH 5.0 or less (14, 19, 23), while the effect of the pH value on the bactericidal action of NCT was also observed in alkaline environments where disproportionation is impossible, this reaction cannot be among the causes.
- It appears more probable that the cause lies with a pH-related change in the microorganism substrate. What comes to mind in this context is the loss of negative

der bakteriziden Wirkung auch im alkalischen Bereich auftritt, wo eine Disproportionierung überhaupt nicht stattfindet, kann letztere ebenfalls nicht als Ursache herangezogen werden.

- Eher wahrscheinlich ist eine pH-bedingte Veränderung des Substrates Mikroorganismus. Hierbei ist vor allem an den Verlust von negativen Ladungen an der Zellmembran der Bakterien bei saurem pH zu denken (Anlagerung von H^+ an ionische Phosphatgruppen). Dadurch könnte NCT, das aufgrund der stark sauren Sulfonsäuregruppe ($pK_a = -0,3$ (24)) im gesamten untersuchten pH-Bereich als negatives Ion vorliegt, leichter in das Bakterium eindringen, da die Neutralisation der Phosphatgruppen mit einer Abnahme von Abstoßungskräften (infolge gleichsinniger Ladungen) verbunden ist.

Hinsichtlich des eigentlichen Abtötungsvorganges sind zwei Mechanismen denkbar:

- Oxydative Zerstörung der Zellwand mit nachfolgender Bakteriolyse und
- Eindringen von NCT in das Zellinnere und Ausschaltung von lebenswichtigen Enzymsystemen.

Beide Mechanismen sind möglich, da das Mureingerüst einerseits Angriffspunkte für eine Chlorübertragung bietet (freie NH-Gruppen von Glutaminsäure, Glucosamine, Glycin etc.), andererseits Moleküle von der Größe des NCT aber gut passieren läßt (25). Sollte NCT die Zellmembran durchdringen, stellen intrazelluläre Angriffspunkte ebenfalls SH- und NH-Gruppen dar, wodurch für den Stoffwechsel wichtige Enzymsysteme (z. B. Energiegewinnung und Atmungskette, vgl. 26) zerstört würden¹.

Stabilität von N-Chlortaurin

NCT unterscheidet sich von den anderen ebenfalls auftretenden oxidativ wirkenden Substanzen durch seine Stabilität (auch in Proteinlösung, Abb. 3-4) und hohe Konzentration und kann daher einen Pool für Oxidationskapazität bilden, der über Stunden anhält. Dies wurde für das von neutrophilen Granulozyten gebildete Chloramingemisch bereits gezeigt (6).

Schlußfolgerungen für die Funktion von N-Chlortaurin in vivo

Aufgrund bisheriger Messungen der Chloraminproduktion von Phagozyten (5, 6, 7) kann erwartet werden, daß die Konzentration von 0,1 mmol/l NCT durch lokale Anreicherung im Entzündungsbereich auftritt. Diese reicht aus, um gram+ und gram- Bakterien abzutöten, in geringem Ausmaß auch *Candida albicans*. Dabei dürfte ein saures Milieu eine entscheidende Rolle spielen: Bei pH 7 dauert das Abtöten der Erreger möglicherweise länger als der Abbau von NCT (und anderen Chloraminen), bei pH 5 hingegen wird die Keimzahl innerhalb von einer Stunde deutlich reduziert, noch bevor die Oxidationskapazität verbraucht sein dürfte. Dies spricht für die Bedeutung des sauren pH-Wertes in Lysosomen und Phago-

charges in bacterial cellular membranes in acid environments (attachment of H^+ to ionic phosphate groups). This effect might enable NCT - which is present in the form of negative ions across the entire pH range investigated because of the presence of the highly acidic sulphonic acid group ($pK_a = -0.3$ (24)) - to penetrate bacteria more easily since the neutralisation of the phosphate groups equalises the polarity of their charges and reduces mutual repulsion.

The bactericidal process itself might conceivably function along two alternative lines:

- Cell wall destruction by oxidation, followed by bacteriolysis, or
- Penetration of NCT into the interior of the cell, followed by the deactivation of vital enzyme systems.

Both mechanisms are possible, since the murein skeleton is vulnerable to chlorine transfer attack (free NH groups in glutamic acid, glucosamines, glycine, etc.) while on the other hand it allows molecules of the size of NCT to pass without hindrance (25). In the event of NCT penetrating the cellular membrane there are SH and NH groups inside that are also vulnerable to an attack which would destroy enzyme systems of vital importance to the metabolism (energy supply, respiratory chain, etc.; cf. (26)).¹

Stability of N-chlorotaurine

Among oxidising substances, NCT is distinguished by its stability even in protein solutions (Figs. 3-4) and its outstanding concentration which enables it to form oxidation capacity pools that will survive for hours. With regard to the mixture of chloramines formed by neutrophil granulocytes, this has already been established (6).

Conclusions Regarding the In-vivo Activity of N-chlorotaurine

Former measurements of the chloramine production of phagocytes (5, 6, 7) suggest that in the vicinity of inflammations, NCT concentrations of 0.1 mmol/l may be reached by accumulation. This is sufficient to kill both gram+ and gram- bacteria including *Candida albicans*, albeit to a limited extent. It is probable that the acidity of the environment plays a decisive role in this process, for at pH 7, the destruction of pathogens may take longer than the degradation period of NCT and other chloramines, while at pH 5, germ counts drop noticeably within one hour, i.e. before the oxidation capacity is likely to be exhausted. This underlines the importance of environmental acidity with regard to lysosomes and phagosomes (pH 5 and below, (25)). Since, however, the concentration of taurine in lysosomes is minimal compared to cytosol (12) while it forms one of the major elements in the supernatant of stimulated phagocytes, the formation of NCT might well be more significant in extra-cellular than in intra-cellular processes. At any rate, the bactericidal effect of NCT would certainly be

¹ Mit NCT und anschließend mit Dichlorfluorescein inkubierte Phagozyten zeigen eine von diesen Zellen ausgehende Fluoreszenz. Dies spricht dafür, daß ein Eindringen von NCT in Zellen, möglicherweise auch Bakterien stattfindet.

¹ Phagocytes incubated first with NCT and later on with dichloro fluorescein acquire endogeneous fluorescence. This seems to indicate that these cells, and possibly even bacterium cells, are indeed penetrated by NCT.

men (pH 5 und tiefer, (25)). Da Taurin jedoch in den Lysosomen nur in sehr geringer Konzentration im Vergleich zum Cytosol vorliegt (12), im Überstand von stimulierten Phagozyten hingegen einen Hauptbestandteil darstellt, könnte die NCT-Bildung für die extrazellulären Vorgänge größere Bedeutung erlangen als für die intrazellulären. Eine Ansäuerung des Extrazellulärraumes durch Exocytose des Inhaltes saurer Granula, Anhäufung von Lactat (sinkende O_2 -Zufuhr durch Stase und Ödem) und Stoffwechselprodukten der Bakterien (Lactat, Acetat, Butyrat etc. (25)) wird die Wirkung von NCT auf jeden Fall verstärken.

Betrachtet man zudem die geringe Reaktionsfreudigkeit von NCT im Vergleich zu stärkeren Oxidantien wie HOCl, ist eine Synthese der beiden bereits eingangs erwähnten, scheinbar gegensätzlichen Hypothesen möglich: NCT könnte ein bakterizides Potential über längere Zeit aufrechterhalten, ohne die körpereigenen Zellen in dem Maße zu schädigen wie HOCl (vgl. 5), welches bei der Reaktion mit Taurin und den anderen Aminosäuren sicher sehr rasch verbraucht wird.

Da erwartet werden kann, daß NCT als mildes körpereigenes Oxidationsmittel weniger toxische Effekte auslöst als diverse körperfremde Substanzen², ist eine Anwendung von NCT in der Humanmedizin zur Desinfektion von Haut, Schleimhäuten (z. B. Nasennebenhöhlen, Bindehautsack des Auges), Brandwunden sowie von Gegenständen, die direkt mit dem Menschen in Berührung kommen (Kontaktlinsen, Zahnprothesen, Gefäßen zur Bereitung bzw. Verabreichung von Babynahrung) denkbar.

Zusammenfassung

N-Chlorotaurin, das einen Hauptbestandteil der oxidierend wirkenden Chloramine darstellt, die bei der Stimulierung von menschlichen Phagozyten durch Reaktion des primär gebildeten Hypochlorit mit Aminogruppen entstehen, wird in vivo eine bakterizide Wirkung und damit auch eine aktive Rolle bei Entzündungsprozessen zugeschrieben.

In dieser Arbeit wird die Wirkung der erstmalig zugänglichen Reinsubstanz N-Chlorotaurin (als Natrium-Salz) auf Bakterien mittels des qualitativen und quantitativen Suspensionsversuchs untersucht: 0,1 mmol/l reduzierte bei pH 5 die Keimzahl von *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* innerhalb von 1–6 h (bei pH 7 innerhalb 24 h) um mehr als drei Zehnerpotenzen. 55 mmol/l (1%) tötete bei pH 7 in 30–45 min 10^7 KBE/ml der Bakterien (auch Vegetativformen von *Bacillus subtilis*) und 10^5 KBE/ml von *Candida albicans* ab. Bei allen untersuchten Keimen wurde ein signifikanter pH-Effekt beobachtet, indem eine pH-Senkung um eine Stufe die bakterizide Wirkung um das 2- bis 5fache erhöht.

Stabilitätsmessungen zeigten, daß N-Chlorotaurin in wäßriger Lösung innerhalb einer Woche bei 20 °C (37 °C) nur um 10% (70%) abnimmt, während es in 3%-Proteinlösung bei 20 °C nach ca. 30 h auf Null gesunken ist.

enhanced by the acidulation of the cellular environment through the exocytosis of acid granules and the accumulation of lactate (declines in the supply of O_2 because of stases and oedemas) and the metabolic products of the bacteria (lactate, acetate, butyrate, etc. (25)).

Furthermore, if we consider the reactivity of NCT which is low compared to that of more powerful oxidants like HOCl, a synthesis of the two seemingly irreconcilable hypotheses mentioned initially appears possible: NCT might well maintain its bactericidal potential for prolonged periods without damaging endogenous cells as badly as HOCl (cf. 5) which is sure to be consumed very quickly as it reacts with taurine and the remaining amino acids.

Since it may be expected that, being a mild, endogenous oxidant, NCT will have fewer toxic effects than diverse exogenous substances² it appears conceivable that NCT might be used in human medicine to disinfect skin, mucose membranes (e.g. those of the sinus or the conjunctival sac), and burns as well as objects coming into immediate contact with human patients (contact lenses, dental prostheses, and receptacles for preparing and/or administering baby food).

Summary

N-chlorotaurine, one of the more important compounds among the oxidising chloramines that are formed as the hypochlorite primarily produced by the stimulation of phagocytes reacts with certain amino groups, is credited with having a certain bactericidal effect in vivo and, by the same token, with playing an active role in inflammatory processes.

Now that N-chlorotaurine is available for the first time in its pure form, i.e. sodium salt, this paper investigates in both qualitative and quantitative suspension tests the effect of that substance on bacteria, which was as follows: 0.1 mmol/l of NCT effected at pH 5 a reduction in the germ count of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* by more than three powers of ten within 1 to 6 hours (within 24 hours at pH 7). At pH 7, 55 mmol/l (1%) destroyed 10^7 CFU/ml of these bacteria inclusive of vegetative forms of *Bacillus subtilis* as well as 10^5 CFU/ml of *Candida albicans* within 30 to 45 min. In all tests, the pH value was observed to have a significant effect in so far as lowering the pH value to the nearest lesser stage would increase the bactericidal effect by a factor of 2 to 5.

Stability tests showed that in an aqueous solution, N-chlorotaurine degrades by a mere 10% (70%) when stored for a week at 20 °C (37 °C), while in a 3% proteine solution, it is down to zero after approximately 30 hours of storage at 20 °C.

These results suggest that N-chlorotaurine does help to preserve oxidation capacity within the defense reaction framework, and that it contributes towards the elimination of bacteria particularly in acid environments. Because of its low toxicity, it is conceivable that NCT might be used in human medicine as a mild disinfectant. ■

² Die 3%ige wäßrige Lösung brennt nicht in den Augen und hat auch im Tierversuch (Kaninchenauge, 9 Tage, 5× täglich Eintropfen) zu keinen sichtbaren Veränderungen der vorderen Augenabschnitte geführt.

² A 3% aqueous solution will not sting when applied to the eyes and failed to cause any visible changes in the anterior eye segment in animal experiments (rabbits, 9 days, drops administered 5 times per day).

Die Ergebnisse machen das Aufrechterhalten von Oxidationskapazität durch N-Chlortaurin im Rahmen von Abwehrreaktionen und seine Beteiligung an der Abtötung von Bakterien, vor allem im sauren Milieu, wahrscheinlich. Aufgrund seiner geringen Toxizität ist eine Anwendung als mildes Desinfektionsmittel in der Humanmedizin denkbar. ■

Literatur/References

1. Harrison JE, Schultz J: Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1976; 251: 1371.
2. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320 (6): 365.
3. Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wei M: Chlorination of taurine by human neutrophils. *J Clin Invest* 1982; 70: 598.
4. Thomas EL: Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against *escherichia coli*. *Infect Immun* 1979; 23: 522.
5. Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas, EL: Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. *J Biol Chem* 1984; 259 (16): 10 404.
6. Test ST, Lampert MB, Ossana PJ, Thoene JG, Weiss SJ: Generation of nitrogen-chlorine oxidants by human phagocytes. *J Clin Invest* 1984; 74: 1341.
7. Lampert M, Weiss SJ: The chlorinating potential of the human monocyte. *Blood* 1983; 62: 645.
8. Weiss SJ, Lampert MB, Test ST: Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity. 1983; *Science* (Wash. DC) 222: 625.
9. Thomas EL: Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride antimicrobial system: effect of exogenous amines on the antibacterial action against *escherichia coli*. *Infect Immun* 1979; 25: 110.
10. Soupart P: Amino Acid Pools (Holden JT, ed) 1962; 220.
11. Fukuda K, Hirai Y, Yoshida H, Nakijima T, Usui T: Free amino acid content of lymphocytes and granulocytes compared. *Clin Chem* 1982; 28: 1758.
12. Green TR, Fellman JH, Eicher AL, Pratt KL: Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1073: 91.
13. Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Roos D: Killing of Schistosomula by taurine chloramine and taurine bromamine. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37 (1): 106.
14. Gottardi W: Preparation and properties of N-chlorotaurine. In preparation.
15. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM): Richtlinien für die Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren, Gustav Fischer Verlag, 1981; 4-7.
16. Block SS: Disinfection, sterilization and preservation, 4. Ed., Lea & Febiger 1991; 1023.
17. Sachs L: Angewandte Statistik, 4. Aufl., New York, Heidelberg, Berlin: Springer, 1974.
18. Zgliczynski JM, Stelmaszynska T, Domanski J, Ostrowski W: Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochim Biophys Acta* 1971; 235: 419.
19. Stelmaszynska T, Zgliczynski JM: Myeloperoxidase of human neutrophilic granulocytes as chlorinating enzyme. *Eur J Biochem* 1974; 45: 305.
20. Weber GR: Effect of concentration and reaction (pH) on the germicidal activity of chloramine-T. *Public Health Reports* 1950; 65 (15): 503.
21. Gottardi W: Wäßrige Chloramin-T-Lösungen als Desinfektionsmittel: Chemische Zusammensetzung, Reaktivität und Toxizität. *Arch Pharm* (Weinheim) 1992; 325: 377.
22. Snyder MP, Margerum DW: Kinetics of Chlorine Transfer from Chloramine to Amines, Amino Acids, and Peptides. *Inorg Chem* 1982; 21: 2545.
23. Lin YY, Wright CE, Zagorski M, Nakanishi K, ¹³C-NMR study of taurine and chlorotaurine in human cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 969: 242.
24. Adrien A, Serjeant EP: The determination of ionization constants, 2. Aufl., Chapman and Hall Ltd., 1971.
25. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS: Microbiology, 3. Aufl., Harper International Ed., 1980; 564, 31 ff., 73 ff.
26. Maier K, Hinze H, Holzer H: Inactivation of enzymes and enzyme inhibitor by oxidative modification with chlorinated amines and metal-catalyzed oxidation systems. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1079(2): 238.