

prof. dr hab. JADWIGA A.
SZYMAŃSKA
dr BARBARA FRYDRYCH
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
90-151 Łódź
ul. J. Muszyńskiego 1

3,7-Dimetylookta- -2,6-dienal (cytral)

Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego¹

NDS: 27 mg/m³

NDSch: 54 mg/m³

NDSP: –

DSB: –

I – substancja o działaniu drażniącym

A – substancja o działaniu uczulającym

Data zatwierdzenia przez Zespół Ekspertów: 22. 06.2010

Data zatwierdzenia przez Komisję ds. NDS i NDN: 14.10.2010

Słowa kluczowe: cytral, narażenie zawodowe, NDS.

Keywords: citral, occupational exposure, MAC value.

3,7-Dimetylookta-2,6-dienal (cytral) jest to oleista ciecz o barwie bladożółtej i intensywnym cytrynowym zapachu. Związek ten jest mieszaniną dwóch izomerów – geranialu i neralu występujących w stosunku 2:1. Cytral jest uzyskiwany przez frakcyjną destylację z trawy cytrynowej, której jest naturalnym składnikiem, bądź na drodze syntezy z izoprenu, geraniolu, nerolu lub linalolu. Stosowany jest wszechstronnie w przemyśle chemicznym i spożywczym, o czym świadczy wielkość produkcji (substancja HPV).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono opisu klinicznego zatrucia ostrego czy przewlekłego cytralem u ludzi. Udowodniono natomiast, że związek ten w kontakcie ze skórą wykazuje działanie drażniące i/lub uczulające.

Na podstawie wyników doświadczeń na zwierzętach (szczury i myszy) wykazano, że cytral jest substancją o małej toksyczności ostrej. Skutkiem przewlekłego, dożołądkowego narażenia zwierząt na cytral było: zahamowanie przyrostu masy ciała, hepatomegalia z hiperplazją i hipertrofią, wzrost aktywności cytochromu P-450 oraz uszkodzenie przedłożądka. Szkodliwe działanie cytralu manifestujące się m.in.: zmniejszeniem przyrostu masy ciała, trudnościami w oddychaniu i pojawieniem się wydzieliny nosowej, zaobserwowano również po inhalacyjnym narażeniu szczurów (ciężarnych samic).

¹ Propozycje wartości NDS i NDSch 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu zostały w 2010 r. przedłożone ministrowi pracy i polityki społecznej (wniosek nr 79) w celu wprowadzenia ich do rozporządzenia w załączniku nr 1 w części A wykazu najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy.

Dane otrzymane z badań, w których zastosowano testy bakteryjne, pozwalają stwierdzić, że cytral nie wykazuje działania mutagennego ani działania genotoksycznego.

Na podstawie wyników badań nad rakotwórczym działaniem cytralu związek ten został zaklasyfikowany przez ACGIH do grupy A4, czyli do substancji nieklasyfikowanych jako czynniki rakotwórcze dla człowieka.

Cytral wchłania się przez: skórę, płuca i drogę pokarmową. Metabolizowany jest na drodze redukcji lub hydratacji podwójnego wiązania, oksydacji grupy aldehydowej lub węgla C-8 i C-9. Główną drogą wydalania powstałych metabolitów jest mocz.

Mechanizm działania toksycznego cytralu jest związany z hamowaniem aktywności dehydrogenazy aldehydowej.

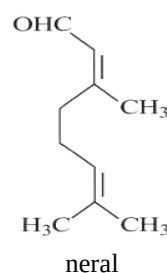
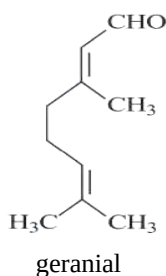
Za skutek krytyczny działania toksycznego cytralu przyjęto działanie drażniące na górne drogi oddechowe, które obserwowano u ciężarnych samic szczurów po narażeniu inhalacyjnym na cytral. Na podstawie danych z badań doświadczalnych zaproponowano przyjęcie stężenia 27 mg/m³ cytralu za wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) związku, a ze względu na jego działanie drażniące przyjęcie stężenia 54 mg/m³ (2 razy wartość NDS) za wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh). Normatywy oznakowano literami: „I” – substancja o działaniu drażniącym oraz „A” – substancja o działaniu uczulającym. Nie ma podstaw merytorycznych do ustalenia wartości dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym (DSB) cytralu.

CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI, ZASTOSOWANIE, NARAŻENIE ZAWODOWE

Ogólna charakterystyka substancji

Ogólna charakterystyka 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu), (NTP 2003; IUCLID 2000; IPCS 2008; RTECS 2010):

- cytral jest mieszaniną dwóch geometrycznych izomerów występujących w stosunku 2:1:
 - geranialu (E-3,7-dimetylo-2,6-octadienal); forma trans; cytral A
 - neralu (Z-3,7-dimetylo-2,6-octadienal); forma cis; cytral B
- wzór sumaryczny $C_{10}H_{16}O$
- wzór strukturalny



- | | |
|-------------------|------------------------------|
| – nazwa CAS | 2,6-oktadienal, 3,7-dimetylo |
| – nazwa EINES | cytral |
| – numer CAS | 5392-40-5 |
| – numer RTECS | RG5075000 |
| – numer EINECS | 226-394-6 |
| – numer indeksowy | 605-019-00-3 |

- synonimy i nazwy handlowe: 3,7-dimetylo-2,6-oktadienal; 2,6-oktadienal, 3,7-dimetyl; cytral; lemonal; Lemsyn GB; Butoben; Butyl p-hydroxybenzoate; Fema Number 2303; NCI-C56348; 2-cis-3,7-dimetylo-2,6-oktadien-1-al.

Cytral, zgodnie z tabelą 3.1. i 3.2. załącznika VI do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (zwane rozporządzeniem GSH), (Dz.Urz. Unii Europejskiej z dnia 31 grudnia 2008 r. L 353), został zaklasyfikowany jako:

- tabela 3.1.: działanie żrące/drażniące na skórę: Skin Irrit. 2; działanie uczulające na drogi oddechowe/skórę: Skin Sens. 1; kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia: H315 działa drażniąco na skórę i H317 może powodować reakcję alergiczną skóry
- tabela 3.2.: R 38 – działa drażniąco na skórę; R 43 – może powodować uczulenie podczas kontaktu ze skórą; Xi – substancja drażniąca.

Właściwości fizykochemiczne substancji

Właściwości fizykochemiczne 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu), (IUCILID 2000; The Merck... 2001; NTP 2003; RTECS 2010; HSDB 2010; IPCS 2008; ChemID plus 2007):

- postać: bledożółta, oleista ciecz o intensywnym cytrynowym zapachu i charakterystycznym słodko-gorzkim smaku, $\text{pH} \leq 5$
- masa cząsteczkowa: 152,23
- temperatura wrzenia: $226 \div 228 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- temperatura topnienia: $< (-10) \text{ }^{\circ}\text{C}$,
- temperatura zapłonu: $82 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $98 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- temperatura samozapłonu: $225 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- gęstość względna d_4^{20} : $0,8888 \text{ g/cm}^3$ (woda = 1, w temp. $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) – geranial
 $0,8869 \text{ g/cm}^3$ (woda = 1, w temp. $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) – neral
 gęstość względna par: 5,3 (powietrze = 1)
- prężność par: $< 1 \text{ hPa}$ (w temp. $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$)
- współczynnik podziału oktanol/woda: $\text{Log P} = 2,76$ (w temp. $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)
- współczynnik załamania światła n_D^{20} : $1,48982$ (w temp. $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) – geranial
 $1,48690$ (w temp. $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) – neral
- rozpuszczalność w:
 - wodzie: $1,34 \cdot 10^3 \text{ mg/l}$ (w temp. $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$), praktycznie nierozpuszczalny
 - rozpuszczalnikach: alkoholu, eterze, glicerolu, glikolu propylenowym i olejach mineralnych
- współczynniki przeliczeniowe (w temp. $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i ciśn. $101,3 \text{ kPa}$): $1 \text{ ppm} \approx 6,39 \text{ mg/m}^3$; $1 \text{ mg/m}^3 \approx 0,16 \text{ ppm}$ (ACGIH 2010).

Otrzymywanie, zastosowanie, narażenie zawodowe)

3,7-Dimetylookta-2,6-dienal (cytral) jest głównym składnikiem ($75 \div 85\%$) olejku uzyskiwanego z trawy cytrynowej. Związek ten jest izolowany przez frakcyjną destylację (HSDB 2010; NTP 2003).

Cytral może być również syntetyzowany:

- z izoprenu przez dehydrogenację mieszaniny geranial-neral otrzymanej z β -pipenu
- przez utlenianie geraniolu, nerolu lub linalolu kwasem chromowym.

Cytral znalazł również zastosowanie jako:

- składnik smakowo-zapachowy przy produkcji:
 - napojów alkoholowych i bezalkoholowych
 - produktów piekarskich, mięsnych
 - serów
 - lodów
 - gumy do żucia
 - cukierków
 - żelatyny
 - przypraw
- aromat (środek zapachowy) w:
 - mydłach
 - detergentach
 - kremach i lotionach
 - perfumach
- półprodukt chemiczny do syntezy:
 - witaminy A
 - jononu
 - metylojononu.

Dopuszczalne dzienne pobranie cytralu (ADI) przez człowieka wynosi 5 mg/kg masy ciała. Związek został zaklasyfikowany do substancji HPV, czyli substancji wytwarzanych w ilościach przekraczających 1000 t/rocznie. Nie ma danych dotyczących produkcji cytralu w Polsce.

DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA LUDZI

Obserwacje kliniczne. Toksyczność ostra u ludzi

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono opisu klinicznego zatrucia ostrego 3,7-dimetylookta-2,6-dienalem (cytralem). Jedyne informacje na temat toksycznego działania cytralu na ludzi dotyczą jego działania drażniącego i/lub uczulającego.

Przez 48 h narażano dermalnie na cytral (32% w acetonie) 50 mężczyzn, ochotników. U ponad 70% ochotników w wyniku narażenia wystąpiły różnego rodzaju zmiany skórne świadczące o podrażnieniu skóry: rumień, obrzęk, grudki i pęcherze (NTP 2003).

Rothenborg i in. (1977) badali działanie drażniące różnego rodzaju detergentów zawierających dodatki o zapachu cytrynowym. Testy płatkowe z użyciem cytralu przeprowadzono w dwóch różnych temperaturach (43 i 23 °C) z trzema różnymi preparatami cytralu. Każdorazowo w badaniach brało udział 12 osób. Zmiany skórne stwierdzano u 8 ÷ 10 osób. Po 20 min narażenia dodatnie wyniki (wystąpienie egzemy na wewnętrznej stronie przedramienia) obserwowano po narażeniu na cytral w wysokiej temperaturze.

Wystąpienie zmian skórnych świadczących o działaniu drażniącym, m.in. cytralu, zaobserwowano u barmanów. Pozytywne wyniki testu płatkowego uzyskano dla geraniolu i cytralu (NTP 2003; ACGIH 2010).

Według danych opublikowanych przez *Opdyke* (1979) 21-dniowe narażenie na cytral o stężeniu 8-procentowym (w parafinie) powodowało średnie podrażnienie skóry (test płatkowy). Zmian takich nie wykazano po 48-godzinym narażeniu na cytral o stężeniach 1- ÷ 8-procentowych. Jednakże powtarzana procedura testu płatkowego z użyciem cytralu o stężeniu 4-procentowym wywołała na skórze zmiany wskazujące na uczulenie. Wystąpienie tych zmian zależało zarówno od wielkości stężenia związku, jak i od częstości narażeń, np. dodatnie wyniki otrzymano po 15-krotnym narażeniu na cytral o stężeniu 0,1-procentowym.

Na podstawie wyników testów płatkowych uzyskanych przez różnych autorów zaklasyfikowano cytral do związków o działaniu alergizującym i drażniącym.

Steltenkamp i in. (1980) na podstawie wyników uzyskanych w 12 500 testach płatkowych stwierdzili, że produkty użytkowe zawierające cytral o stężeniach mniejszych niż 0,5-procentowe nie powodują podrażnienia oraz wystąpienia reakcji alergicznych.

Heydorn i in. (2003) w grupie 586 osób, u których stwierdzono egzemę, przeprowadzili badanie działania uczulającego i drażniącego różnych środków zapachowych. Do badań stosowano m.in. 2-procentowy roztwór cytralu (w parafinie). U 28 osób wynik testu płatkowego był dodatni, a u 82 niepewny (wątpliwy).

Schnuch i in. (2007) badali działanie uczulające 26 środków zapachowych w grupie liczącej 21 325 osób. Każdy pojedynczy związek był badany na grupie liczącej od 1658 do 4238 osób. Działanie uczulające cytralu stwierdzono u 0,6% osób poddanych badaniu.

Obserwacje kliniczne. Toksyczność przewlekła u ludzi

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono opisu klinicznego zatrucia przewlekłego ludzi cytralem.

Badania epidemiologiczne

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych epidemiologicznych dotyczących zawodowego narażenia na cytral.

DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA ZWIERZĘTA

Toksyczność ostra i przedłużona

W tabeli 1. zamieszczono wartości medialnych dawek śmiertelnych 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu). Wartość LD₅₀ cytralu dla szczura po podaniu dożołądkowym wynosiła 4960 mg/kg. Największa dawka cytralu niepowodująca zgonu myszy wynosiła 900 mg/kg (podanie dożołądkowe) oraz 250 mg/kg po podaniu dootrzewnowym (*Opdyke* 1979). Wartość LD₅₀ cytralu dla królików po narażeniu dermalnym wynosiła 2250 mg/kg.

Cytral był czynnikiem drażniącym dla wielu gatunków zwierząt. Działanie takie wykazano u albinotycznych królików Angora i samców świnek morskich Hartley narażanych przez 24 h na działanie cytralu podawanego na skórę w ilości 100 mg (NTP 2003). Podobne rezultaty uzyskano w doświadczeniu z użyciem świnek morskich Hartley narażanych na działanie cytralu o stężeniach 0,2- ÷ 5-procentowych (aceton-glikol polietylenu 400; 70: 30 v/v) podawanego tą samą drogą (NTP 2003). Indukcja podrażnienia skóry myszy wywołana działaniem cytralu korelowała z poziomem aktywności w skórze enzymów: dekarboksylazy ornitynowej i dekarboksylazy S-adenozynometioninowej (enzymów uczestniczących w biosyntezie poliamin), (NTP 2003).

Tabela 1.

Wartości medialnych dawek śmiertelnych 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu) dla różnych gatunków zwierząt

Gatunek zwierząt	Wartość DL ₅₀ , mg/kg	Piśmiennictwo
Narażenie drogą pokarmową		
Szczur	6800	RTECS 2010;
	4950	OECD 2001;
	4960	HSDB 2010;
		IUCLID 2000
Mysz	900	
	1440	RTECS 2010;
	1670	OECD 2001;
	3297	HSDB 2010;
	6000	IUCLID 2000
Narażenie drogą dootrzewnową		
Mysz	140 ÷ 210	
	360	HSDB 2010;
	460	IUCLID 2000
	250	
Szczur	450	HSDB 2010;
	460	RTECS 2010
Narażenie drogą dermalna		
Królik	2250	RTECS 2010;
		HSDB 2010;
		OECD 2001
Szczur	>2000	IUCLID 2000

Na skórze królików w wyniku 24-godzinnego kontaktu z cytralem wystąpiły zmiany świadczące o działaniu drażniącym, określanym jako działanie od umiarkowanego do znacznego (Opdyke 1979). Cytral (0,5 ml, r-r nierozcieńczony) był przyczyną wystąpienia na skórze królików rumienia i obrzęku o charakterze umiarkowanym (OECD 2001). Związek ten nie działał drażniąco na oczy królików (OECD 2001).

Działanie uczulające badano na świnkach morskich metodą Buehlera (bez adjuwanta). Zwierzętom podawano cytral o stężeniach 1- ÷ 8-procentowych. Największym stężeniem niepowodującym zmian na skórze zwierząt było stężenie 1-procentowe. Po narażeniu na cytral 8-procentowy (w acetonie) u 4/5 zwierząt wystąpiły zmiany skórne (Opdyke 1979).

Toksyczność podprzewlekła i przewlekła

W wyniku narażenia szczurów (samce szczepu Wistar, $n = 5$) na cytral podawany drogą pokarmową w dawce 1500 mg/kg m.c. (rozpuszczony w oleju kukurydzianym) przez 5 dni u zwierząt zaobserwowano wzrost masy wątroby, któremu towarzyszyła hiperplazja i hipertrofia (tab. 2.). Hiperplazja była wywołana wzrostem syntezy DNA, natomiast hipertrofia charakteryzowała się proliferacją retikulum endoplazmatycznego, peroksysomów i mitochondriów. Zmianom tym towarzyszył wzrost (dwukrotny) poziomu cytochromu całkowitego P-450, będący wynikiem wzrostu aktywności izoenzymu CYP 4A1. W doświadczeniu tym zanotowano również wzrost aktywności enzymów wątrobowych, tj.: transferazy glukuronowej, reduktazy 4-nitrobenzoesowej oraz hydrolazy bifenylowej (Roffey i in. 1990).

Tabela 2.

Objawy działania toksycznego 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu) na zwierzęta doświadczalne w wyniku narażenia wielokrotnego

Gatunek zwierząt, płeć	Stężenie		Czas narażenia	Objawy	Piśmiennictwo
Narażenie drogą pokarmową					
Szczur Wistar, samce n = 5	1500 mg/kg		5 dni	wzrost poziomu cytochromu P-450 i CYP4A1; wzrost aktywności enzymów wątrobowych; nasilona proliferacja peroksozomów; hiperplazja i hipertrofia hepatocytów	Roffey i in. 1990
Szczur Wistar i Long-Evans, samce n = 20	2400 mg/kg		3 lub 10 dni	hepatomegalia (oba szczepy); wzrost poziomu DNA w wątrobie (3. dzień, Long-Evans); wzrost poziomu β-oksydacji palmitoilo-CoA (oba szczepy)	Jackson i in. 1987
Szczur F344, samce i samice, n = 5	0; 142; 285; 570; 1140; 2280 mg/kg (pożywienie)		14 dni	zahamowanie przyrostu masy ciała (2 największe dawki); zmniejszenie masy wątroby, nerek, śledziony (dawka największa); zmiany histopatologiczne nabłonka dróg oddechowych (2 największe dawki)	Dieter i in. 1993
Szczur F344, samce i samice, n = 5	0; 570; 1140; 2280 mg/kg (sonda)		14 dni	minimalna hiperplazja nabłonka łuskowatego przedłożadka (największa dawka)	Dieter i in. 1993
Mysz B6C3F1, samce i samice, n = 5	0; 534; 1068; 2137; 4275; 8550 mg/kg (pożywienie)		14 dni	zahamowanie przyrostu masy ciała (największa dawka)	Dieter i in. 1993
Mysz B6C3F1, samce i samice, n = 5	0; 534; 1068; 2137 mg/kg (sonda)		14 dni	padnięcie wszystkich zwierząt (po największej dawce) i 2/5 samców (dawka 1068 mg/kg); zależny od dawki wzrost masy wątroby u wszystkich zwierząt; wakuolizacja cytoplazmy hepatocytów (samice 2 największe dawki i samce największa dawka); nekroza, owrzodzenie i ostre zapalenie przedłożadka (wszystkie zwierzęta, największa dawka)	Dieter i in. 1993
Szczur F344/N, samce i samice, n = 10	samce: 0; 345; 820; 1785; 1585 mg/kg (pożywienie)	samice: 0; 335; 675; 1330; 2125 mg/kg (pożywienie)	14 dni	hiperplazja i hiperkeratoza nabłonka przedłożadka (wszystkie zwierzęta, największa dawka); atrofia szpiku (wszystkie zwierzęta, 2 największe dawki); nefropatia (samce, wszystkie dawki); aspermia(samce, największa dawka)	NTP 2003

cd. tab.2.

Gatunek zwierząt, płeć	Stężenie		Czas narażenia	Objawy	Piśmiennictwo
Mysz B6C3F ₁ , samce i samice <i>n</i> = 10	samce: 0; 745; 1840; 3915; 8110 mg/kg (po- żywie- nie)	samice: 0; 790; 1820; 3870; 7550 mg/kg (poży- wienie)	14 dni	zahamowanie przyrostu masy ciała; limfopenia (samce i samice, 2 największe dawki); pogrubienie ściany przedzołádka (samce i samice, 2 największe dawki); atrofia jajników (samice, 2 największe dawki)	NTP 2003
Szczur Crj:CD, samce i samice	0; 40; 200; 1000 mg/kg (sonda)		46 dni (samce) 39 ÷ 50 dni (samice)	pogrubienie warstwy śluzówkowej żołądka (samce, największa dawka); hiperplazja przedzołádka	OECD 2001
Szczur Osborne-- Mendel, samce i samice	1000; 2500; 10000 ppm		13 tygo- dni	bez zmian w masie ciała i narządach wewnętrznych; bez zmian histopatologicznych	<i>Hagan i in.</i> 1967
Szczur F344/N, samce i samice, <i>n</i> = 50	0; 50; 100; 210 mg/kg (z pożywieniem)		2 lata	zahamowanie przyrostu masy ciała (samce i samice, największa dawka)	NTP 2003
Mysz B6C3F ₁ , samce i samice, <i>n</i> = 50	0; 60; 120; 260 mg/kg (z pożywieniem)		2 lata	zahamowanie przyrostu masy ciała (samce i samice, 2 największe dawki); zapalenie i owrzodzenie śluzówki jamy ustnej (wszystkie zwierzęta)	NTP 2003
Narażenie drogą dermalną					
Szczur Sprague- -Dawley, samce	1 mg/kg		30 dni	łagodna, atypowa hiperplazja prostaty	NTP 2003
Szczur Wistar, samce	150 mg/kg		10 20 30 60 90 dni (5 dni/ tydzień)	łagodna, atypowa hiperplazja prostaty	NTP 2003
Szczur, samce	185 mg/kg		90 dni	hiperplazja gruczołów łojowych	NTP 2003
Szczur, samce	62 mg		4 miesiące	hiperplazja prostaty bez zmiany masy narządu	NTP 2003

Samce szczurów szczepu Wistar i Long-Evans (*n* = 20) narażano drogą dożołądkową na cytral w dawce 2400 mg/kg m.c. (rozpuszczony w oleju kukurydzianym) przez 3 lub 10 dni. W trakcie trwania eksperymentu w grupach zwierząt narażanych na cytral zanotowano mniejsze, w porównaniu z grupą kontrolną, spożycie paszy. Charakterystyczną zmianą zanotowaną u obu szczepów szczurów narażanych przez 3 lub 10 dni była hepatomegalia. W trzecim dniu trwania eksperymentu u szczurów szczepu Long-Evans stwierdzono, że hepatomegalii towarzyszył wzrost poziomu wątrobowego DNA. Natomiast w 10. dniu trwania eksperymentu hepatomegalii towarzyszyły zmiany rozmieszczenia w komórkach wątroby lipidów i glikogenu. U obu szczepów szczurów narażanych na cytral wzrósł znacząco, w porównaniu z grupą kontrolną, poziom β -oksydacji

palmitoilo-CoA (biochemicznego markera świadczącego o morfologicznych zmianach w peroksy-somach). Nie zanotowano zmian w poziomie cytochromu całkowitego P-450 w żadnej badanej grupie zwierząt (Jackson i in. 1987).

Dieter i in. (1993) badali toksyczność cytralu podawanego drogą pokarmową przez 14 dni w dwóch wariantach: podanie z użyciem sondy oraz podanie cytralu wraz z pożywieniem (w postaci mikrokapsulek). Eksperyment został przeprowadzony na samcach i samicach szczurów F344/N ($n = 5$) oraz samcach i samicach myszy B6C3F₁ ($n = 5$). Cytral wraz z pożywieniem podawano w paszy o stężeniach: 394; 4750; 9500; 19 000 lub 38 000 ppm, co według autorów odpowiadało średniej dawce dziennej: 142; 285; 570; 1140 lub 2280 mg/kg m.c. szczurów oraz: 534; 1068; 2137; 4275 lub 8550 mg/kg m.c. myszy. W wyniku takiego narażenia zanotowano znaczące, w porównaniu z grupą kontrolną, zmniejszenie przyrostu masy ciała w grupie szczurów narażanych na dwie największe dawki cytralu (1140 lub 2280 mg/kg) oraz w grupie myszy narażanych na największą dawkę cytralu (8550 mg/kg). Ponadto największa dawka cytralu podawana szczurom spowodowała zmniejszenie masy: wątroby, nerek i śledziony. Dawki 1140 lub 2280 mg/kg spowodowały u szczurów hiperplazję i/lub metaplazję nabłonka przedniej części odcinka nosowego.

Cytral podawano dożołądkowo szczurom ($n = 5$) sondą w dawkach: 570; 1140 lub 2280 mg/kg m.c., a myszom w dawkach: 534; 1068 lub 2137 mg/kg m.c. przez 14 dni. W grupie szczurów narażanych w ten sposób nie wykazano żadnych zmian toksycznych będących wynikiem narażenia na cytral, z wyjątkiem niewielkiej hiperplazji nabłonka przedżołądka (po największej dawce). Natomiast u myszy po takim narażeniu zanotowano wiele zmian świadczących o szkodliwym działaniu cytralu. Przede wszystkim po największej dawce (2137 mg/kg m.c.) nastąpiło padnięcie wszystkich zwierząt w grupie, natomiast po dawce 1068 mg/kg padły dwa samce myszy. Zarówno u samic, jak i samców myszy zanotowano, zależny od wielkości dawki, wzrost masy wątroby. Dawka 1068 mg/kg cytralu spowodowała zapalenie i hiperplazję przedżołądka, natomiast dawka największa (2137 mg/kg) była przyczyną: martwicy, owrzodzenia i ostrego zapalenia przedżołądka myszy jako wyniku działania drażniącego związku. Wakuolizację cytoplazmy hepatocytów zanotowano w grupie samic myszy narażonych na dawki 1068 lub 2137 mg/kg m.c. i grupie samców myszy narażonych na dawkę 2137 mg/kg m.c. (Dieter i in. 1993). Wartości otrzymane na podstawie wyników z tych doświadczeń uznano za wartość NOAEL (tab. 3.).

W ramach badań NTP (2003) przeprowadzono 14-dniowy eksperyment na samcach i samicach dwóch gatunków zwierząt: szczurach F344/N ($n = 10$) i myszach B6C3F₁ ($n = 10$). Cytral podawano wraz z paszą (w postaci mikrokapsulek) o stężeniach: 3900; 7800; 15600 lub 31300 mg/kg diety. Zastosowane stężenia cytralu u szczurów odpowiadały średniej dziennej dawce: 345; 820; 1785 lub 1585 mg/kg m.c. dla samców oraz 335; 675; 1330 lub 2125 mg/kg m.c. dla samic. W grupie szczurów narażanych na cytral skutki jego toksycznego działania dotyczyły: nabłonka przedżołądka, szpiku oraz nerek. Wykazano hiperplazję i hiperkeratozę nabłonka przedżołądka szczurów obu płci narażanych na dawkę największą (31300 ppm), przy czym skutek ten był silniejszy u samic. Zmianom tym nie towarzyszył proces zapalny. Rezultatem takiego narażenia była również aplazja szpiku, charakteryzująca się zmniejszeniem liczby komórek mielopoetycznych i wzrostem liczby komórek tłuszczowych, która wystąpiła w grupie zwierząt narażonych na dawki: 1785 lub 1585 mg/kg (samce) oraz 1330 lub 2125 mg/kg (samice). Największa dawka cytralu spowodowała również wystąpienie w szpiku krwotoków, charakteryzujących się utratą integralności naczyńkowej zatoki i wynaczynieniem erytrocytów w całym szpiku. Minimalna atrofia z uszkodzeniem linii granicznej, której nie towarzyszył krwotok, wystąpiła w grupie zwierząt narażonych na dawkę 1785 mg/kg cytralu. U wszystkich narażanych samców szczurów zanotowano objawy nefropatii, przy czym nasilenie zmian było skorelowane z wielkością narażenia. Nefropatia charakteryzowała się ogniskami regeneracji nabłonka kanalików i występowaniem w ich świetle kwasochłonnych wałeczków; naciekami śródmiąższowymi z komórek jednojądrowych oraz poszerzeniem cewek nerkowych. Największa dawka cytralu spowodowała wystąpienie u samców aspermii.

Tabela 3.

Wartości NOAEL i LOAEL wyznaczone po narażeniu zwierząt na 3,7-dimetylookta-2,6-dienal (cytral) drogą pokarmową

Gatunek zwierząt	Droga podania związku	Okres narażenia	Dawki, mg/kg	Wartość NOAEL, mg/kg/dzień	Wartość LOAEL, mg/kg/dzień	Miejsce uszkodzenia	Piśmiennictwo
Szczur	w pożywieniu (kapsułki)	14 dni	142 ÷ 2280	570	1140	jama nosowa	Dieter 1993
Szczur	dożołądkowo	14 dni	570 ÷ 2280	1140	2280	przedżołądek	Dieter 1993
Szczur	dożołądkowo	46 dni	40 ÷ 1000	200	1000	przedżołądek	OECD 2001
Szczur	w pożywieniu	13 tygodni	83 ÷ 833	833	–	–	Hagan 1967
Mysz	w pożywieniu (kapsułki)	14 dni	534 ÷ 8550	8550	–	–	Dieter 1993
Mysz	dożołądkowo	14 dni	534 ÷ 2137	534	1068	przedżołądek, wątroba	Dieter 1993

Zastosowane stężenia cytralu w narażeniu myszy odpowiadały średnim dziennym dawkom: 745; 1840; 3915 lub 8110 mg/kg m.c. dla samców oraz: 790; 1820; 3870 lub 7550 mg/kg m.c. dla samic. Cytral powodował u myszy zahamowanie, skorelowane z wielkością dawki, przyrostu masy ciała. W grupie samców narażanych na największą dawkę cytralu padło 4/10 zwierząt. Narażenie na dwie największe dawki wywołało u obu płci limfopenię, również spadek liczby limfocytów był zależny od wielkości dawki. Na podstawie wyników badań histopatologicznych wykazano, że w grupie myszy narażanych na cytral o stężeniach: 3915 lub 8110 mg/kg (samce) i 3870 lub 7550 mg/kg (samice) obserwowano około 2-5-krotne pogrubienie ściany przedżołądka oraz zmiany w warstwie śluzówkowej i podśluzówkowej (pofałdowania). U samic myszy narażonych na dwie największe dawki cytralu zanotowano znaczący wzrost przypadków wystąpienia atrofii jajników (NTP 2003).

Cytral podawano dożołądkowo (sonda) szczurom Crj:CD przez okres 46 dni (samce) i 39 ÷ 50 dni (samice) w dawkach: 40; 200 lub 1000 mg/kg m.c. W ogólnym wyglądzie i zachowaniu zwierząt nie zanotowano żadnych zmian. Natomiast sekcja ujawniła, że największa ze stosowanych dawek cytralu spowodowała pogrubienie warstwy śluzówkowej żołądka (samice), a badania histopatologiczne przedżołądka wykazały obecność u obu płci zmian o charakterze hiperplazji, owrzodzenia i ziarninowania (zmiany będące skutkiem działania drażniącego). Wartość NOAEL autorzy pracy ustalili na poziomie 200 mg/kg m.c. (OECD 2001).

Hagan i in. (1967) narażali samce i samice szczurów Osborne-Mendel przez 13 tygodni na cytral podawany z paszą o stężeniach: 1000; 2500 lub 10 000 ppm (83 ÷ 833 mg/kg). W grupach narażanych zwierząt nie zanotowali oni żadnych zmian dotyczących: masy ciała, masy narządów wewnętrznych czy też zmian histopatologicznych. Za wartość NOAEL przyjęto dawkę 833 mg/kg m.c. Jednakże autorzy podkreślili, że ze względu na znaczną lotność cytralu, dawki faktycznie spożyte przez zwierzęta były znacznie mniejsze niż planowane do spożycia.

W ramach badań NTP (2003) przeprowadzono, oprócz 14-dniowego eksperymentu, również eksperyment trwający 2 lata. Warunki eksperymentu były podobne, cytral podawano wraz z paszą (w postaci mikrokapsulek) szczurom F344/N i myszom B6C3F₁ (samce i samice, po 50 zwierząt w grupie). Zastosowane u szczurów stężenia cytralu z paszą wynosiły: 1000; 2000 lub 4000 ppm, co odpowiadało dawkom: 50; 100 lub 210 mg/kg m.c., natomiast myszom podawano cytral o stężeniach w paszy: 500; 1000 i 2000 ppm, co odpowiadało dawkom: 60; 120 lub 260 mg/kg m.c. Narażenie 2-letnie szczurów na cytral nie spowodowało zwiększonej liczby padnięć zwierząt w grupach narażanych w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej. Również spożycie paszy we

wszystkich grupach było podobne. Jedyną zmianą odnotowaną w grupie szczurów narażanych na największą dawkę było zmniejszenie średniej masy ciała obserwowane od 25. tygodnia w grupie samic i od 49. tygodnia w grupie samców. Natomiast myszy okazały się gatunkiem bardziej wrażliwym na działanie cytralu. Pomimo iż spożycie paszy we wszystkich grupach zwierząt było podobne, to po 2-letnim narażeniu myszy na dawki 120 lub 260 mg/kg cytralu stwierdzono około 10-procentowy spadek masy ciała zwierząt. Cytral powodował również u wszystkich myszy uszkodzenie śluzówki jamy ustnej o charakterze zapalenia i owrzodzenia (będące wg autorów prawdopodobnie wtórnym skutkiem działania związku).

Servadio i in. (1986) przeprowadzili eksperyment na samcach szczurów Wistar, którym cytral w dawce 150 mg/kg podawali na skórę 5 dni w tygodniu przez: 10, 20, 30, 60 lub 90 dni. Stwierdzili oni, że cytral powodował u szczurów łagodną i atypową hiperplazję prostaty. Przypadki występowania zmian rozrostowych zanotowano już po 10 dniach trwania narażenia, a po 30 dniach narażenia na cytral hiperplazja prostaty była znacznie częstsza (NTP 2003).

Podobne rezultaty uzyskano u szczurów Wistar narażanych dermalnie na całkowitą dawkę 185 mg/kg oraz narażanych przez 30 dni na dawkę 1 mg/kg cytralu (NTP 2003). Mechanizm odpowiedzialny za indukcję przez cytral hiperplazji prostaty nie został poznany. Przypuszcza się jednak, że cytral reaguje we krwi z testosteronem i/lub estrogenem, co prawdopodobnie prowadzi do powstania tego typu uszkodzeń (NTP 2003).

Cytral indukował hiperplazję gruczołów łojowych u samców szczurów narażanych dermalnie na dawkę 185 mg/kg cytralu przez 90 dni. O hiperplazji świadczył rozrost nie w pełni zróżnicowanych komórek w gruczołach łojowych (NTP 2003).

W wyniku 4-miesięcznego narażenia samców szczurów na cytral, podawany na skórę w ilości 62 mg, stwierdzono hiperplazję komórek nabłonka gruczołowego i międzygruczołowego podścieliska prostaty. Nie zanotowano natomiast negatywnego wpływu cytralu na masę tego narządu (NTP 2003).

ODLEGŁE SKUTKI DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

Działanie mutagenne i genotoksyczne

Aktywność mutagenną 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu) badano na szczepach testowych *Salmonella Typhimurium*: TA97, TA98, TA100, TA102; TA1535 i TA1537. Badania te prowadzono w dwóch wariantach: z dodatkiem lub bez dodatku aktywatora – frakcji S9. Negatywne wyniki w teście Ames'a, uzyskane we wszystkich wariantach doświadczenia wskazują, że cytral nie wykazuje działania mutagennego (tab. 4.).

Tabela 4.

Wyniki badań mutagenności i genotoksyczności 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu)

Rodzaj testu	Gatunek/szczep/typ	Stężenie	Wynik	Piśmiennictwo
Mutacje powrotne	<i>Salmonella Typhimurium</i> TA 102; TA 100; TA 98; TA 97	5 ÷ 700 µg/płytkę	negatywny [+S9 i –S9]	<i>Gomes-Carneiro</i> i in. 1998;
	<i>Salmonella Typhimurium</i> TA 92; TA 94; TA 98; TA 100; TA 1535; TA 1537	do 100 µg/płytkę	negatywny [+S9 i –S9]	<i>Ishidate</i> i in. 1984
	<i>Salmonella Typhimurium</i> TA 98; TA 100; TA 1535; TA 1537	do 220 µg/płytkę	negatywny [+S9 i –S9]	NTP 2003

cd. tab. 4.

Rodzaj testu	Gatunek/szczep/typ	Stężenie	Wynik	Piśmiennictwo
Aberracje chromosomowe Wymiana chromatyd siostrzanych Test mikrojąderkowy (szpik kostny) Test mikrojąderkowy (erytrocyty)	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA 98; TA 100; TA 1535; TA 1537	do 10 mg/płytke	negatywny [+S9 i -S9]	Zeiger i in. 1987
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA 100	–	negatywny [+S9 i -S9]	Lutz i in. 1982
	<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> (<i>trp</i> -)	–	negatywny	Ishidate i in. 1984
	komórki CH	do 70,7 µg/ml	negatywny [+S9 i -S9]	NTP 2003
	komórki CH	do 40,2 µg/ml	pozytywny [+S9 i -S9]	NTP 2003
	samce myszy B6C3F1	do 750 mg/kg/dzień i.p.; 3 dni	negatywny	NTP 2003
	samce, samice myszy B6C3F1	do 31,300 ppm kapsułki; 14 tygodni	negatywny	NTP 2003

Objaśnienia:

(+S9) aktywacja (dodanie frakcji S9); (-S9) brak aktywacji.

Według danych z piśmiennictwa, cytral nie wywołuje również aberracji chromosomalnych, o czym świadczą negatywne wyniki uzyskane w testach przeprowadzonych z użyciem komórek chomika chińskiego. Natomiast w teście z użyciem tych samych komórek wykazano zdolność cytralu do wywołania wzrostu częstości wymiany chromatyd siostrzanych (tab. 4.).

Brak działania genotoksycznego cytralu wykazały również testy w warunkach *in vivo*. Negatywne rezultaty, tzw. testu mikrojąderkowego, uzyskano w doświadczeniach przeprowadzonych na myszach, którym badany związek podawano dootrzewnowo w dawkach 250 ÷ 750 mg/kg przez 3 dni. Podobne rezultaty uzyskano w doświadczeniu, w którym myszy były narażane na cytral podawany z pożywieniem przez 14 tygodni.

Działanie rakotwórcze

Informacje na temat działania rakotwórczego 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu) na zwierzęta pochodzą z 2-letnich badań przeprowadzonych na szczurach i myszach obu płci (NTP 2003). Badany związek podawano zwierzętom (myszom B5C3F1 i szczurom F344, *n* = 50) w postaci mikrokapsulek wraz z pożywieniem (tab. 2.). W grupie narażanych szczurów nie stwierdzono żadnych zmian o charakterze nowotworowym, które można byłoby przypisać działaniu cytralu. Natomiast w grupie myszy (samic) narażonych na dawki 260 mg/kg/dzień cytralu w paszy (2000 ppm) odnotowano w porównaniu z grupą kontrolną wzrost statystycznie znamienny występowania przypadków chłoniaka złośliwego. Tkankami najczęściej atakowanymi przez chłoniaka były: śledziona, węzły limfatyczne krezkowe, grasica oraz, w mniejszym stopniu, jajniki. Inne obserwowane u narażanych samic myszy zmiany o charakterze nowotworowym, tj. gruczolak/rak płuc czy gruczolak wątrobowokomórkowy nie były istotne statystycznie. Nie ma ewidentnych dowodów na działanie rakotwórcze cytralu u samców myszy. Autorzy tych badań (NTP 2003) uważają, że stwierdzenie zmian nowotworowych jedynie u samic myszy nie może być podstawą do zaklasyfikowania cytralu do grupy czynników rakotwórczych.

W ACGIH (2010) zaliczono cytral do grupy A4, czyli do substancji nieklasyfikowanych jako czynniki rakotwórcze dla człowieka.

Działanie embriotoksyczne, teratogenne oraz wpływ na rozrodczość

Noqueira i in. (1995) przeprowadzili doświadczenie oceniające działanie embriotoksyczne 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu) na szczurach, samicach szczepu Wistar ($n = 5$). Badany związek, po rozpuszczeniu w oleju słonecznikowym, podawano dożołądkowo od 6. do 15. dnia ciąży w dawkach: 60; 250; 500 lub 1000 mg/kg. Grupę kontrolną stanowiły samice otrzymujące sam olej słonecznikowy. W 21. dniu trwania ciąży wykonano cięcie cesarskie i oceniano liczbę resorpcji oraz miejsca implantacji (zagnieżdżenia się jaja).

Wyniki doświadczenia wykazały, że cytral był toksyczny dla matek, o czym świadczy zmniejszenie przyrostu masy ciała samic między 6. a 11. dniem ciąży w grupach narażanych na najmniejszą dawkę cytralu oraz zmniejszenie masy macicy w grupie samic narażanych na dawkę największą. Słaby, ale statystycznie znamieny wzrost współczynnika resorpcji obserwowano w grupach narażanych na dawki cytralu 60 lub 125 mg/kg m.c. Dawki większe niż 125 mg/kg związku wywołały, zależną od wielkości dawki, redukcję współczynnika ciężarnych zwierząt do liczby kopulujących zwierząt. U płodów narażanych prenatalnie na cytral w dawkach większych niż 60 mg/kg m.c. zaobserwowano zaburzenia zdolności widzenia oraz zwiększoną liczbę niewielkich nieprawidłowości dotyczących szkieletu (żeber, czaszki, mostka i kręgu szczytowego). Wyniki uzyskane w tym eksperymencie pozwoliły na wyznaczenie wartości NOAEL cytralu poniżej 60 mg/kg m.c.

Toaff i in. (1979) przeprowadzili badania, w których cytral był podawany dwiema drogami. Dwadzieścia osiem dziewiczych samic szczurów Wistar narażano dootrzewnowo na cytral w dawce 300 mg/kg, podawany 1. dnia fazy pro-estrus przez 6 kolejnych cykli. Grupę kontrolną dla tej grupy stanowiły zwierzęta otrzymujące olej, medium, w którym rozpuszczano cytral. Drugą grupę stanowiły samice szczurów, którym cytral podawano dermalnie (w 70-procentowym etanolu) w dawce 460 mg/kg przez 60 dni ($n = 19$) oraz przez 100 dni ($n = 17$). Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta narażane dermalnie na sam etanol. Pierwszego dnia fazy pro-estrus kilka zwierząt zabijano, natomiast pozostałe umieszczano w klatkach z samcami. Potomstwo ważono i mierzono 1., 7. i 21. dnia po urodzeniu. Autorzy pracy stwierdzili, że cytral podawany, zarówno drogą dootrzewnową, jak i dermalną, powodował zmniejszenie liczby płodów oraz wpływał negatywnie na ich wymiary. Ponadto w obu doświadczeniach wykazano, że cytral wyraźnie redukował liczbę pęcherzyków jajnika, zarówno pierwotnych (zawiązkowych), jak i pośrednich. Ten skutek był bardziej zaznaczony u zwierząt, które przyjmowały dawkę 460 mg/kg m.c. badanego związku dermalnie przez 100 dni. Zmniejszeniu liczby pęcherzyków jajnika towarzyszył wzrost liczby pęcherzyków z III typem atrezji (zarośnięcie otworu), charakteryzowanej jako zmiana zwyrodnieniowa oocytów. Cytral nie wpływał na liczbę ciałek żółtych. Autorzy pracy podkreślają, że indukowane przez cytral zmiany zwyrodnieniowe pęcherzyków jajnika i oocytów były innego rodzaju niż zmiany wywołane działaniem czynników alkilujących lub promieniowania X. Ponadto, na podstawie zwiększenia liczby przypadków atrezji typu III (a nie typu I lub II) autorzy pracy uważają, że cytral nie zaburza równowagi endokrynnej u zwierząt, jednakże teza ta nie została potwierdzona pomiarem stężenia hormonów. W doświadczeniu tym nie zanotowano toksycznego wpływu cytralu na matki.

Gaworski i in. (1992) przeprowadzili doświadczenie na ciężarnych samicach szczurów szczepu Sprague-Dawley. Cytral był podawany drogą inhalacyjną 6 h dziennie przez okres od 6. do 15. dnia trwania ciąży o stężeniach: 0; około 64 (10 ppm) lub około 217 mg/m³ (34 ppm) w postaci pary lub około 435 mg/m³ (68 ppm) jako mieszaniny aerozolu i pary.

Takie zmiany, jak: zmniejszenie przyrostu masy ciała, zmętnienie rogówki, trudności w oddychaniu oraz pojawienie się wydzieliny nosowej i ślinienia się, zaobserwowane w grupie samic narażanych na cytral o największym stężeniu 435 mg/kg (68 ppm), świadczące o szkodliwym działaniu związku na

matki były prawdopodobnie wynikiem jego działania drażniącego. U płodów prenatalnie narażonych na cytral o stężeniu 435 mg/kg (68 ppm) stwierdzono nieznaczne zmniejszenie masy ciała oraz niewielki wzrost częstości występowania przypadków hipoplazji kości (łędźwiowej i łonowej). Skutków takiego działania nie stwierdzono w grupach samic narażonych na cytral o mniejszym stężeniu. Narażenie na cytral nie wpłynęło również na liczbę: ciałek żółtych, zapłodnień, resorpcji, płodów, a także ich masę ciała oraz zdolność do życia i współczynnik płci. Za wartość NOAEL cytralu przyjęto stężenie 217 mg/m³ (34 ppm).

Według autorów pracy cytral podawany drogą inhalacyjną ciężarnym szczurom nie wykazywał działania toksycznego na płód, jeżeli poziom narażenia nie przekraczał stężenia toksycznego dla matek.

Działanie embriotoksyczne cytralu wykazał *Abramovici* (1972). Cytral o stężeniach 0,1 ÷ 100 mM był podawany do przestrzeni blastodermalnej 3-dniowych embrionów kurczaków. Wynikiem takiego narażenia były uszkodzenia w obrębie: głowy, ciała, kończyn i ogona. Zniekształcenia kończyn dotyczyły mikromelii (małe kończyny), fokomelii (wrodzony brak bliższych części kończyn) oraz oligodaktylii (zmniejszenie liczby palców). Natomiast zmiany w obrębie głowy będące wynikiem takiego narażenia to: wrodzony brak oczu, małoocze, częściowy brak czaszki oraz zniekształcenia dziobu. W późniejszym doświadczeniu z użyciem tych samych modeli wykazano, że cytral zakłócał tworzenie w mięśniach prążkowanych włókienek mięśniowych (*Abramovici* i in. 1973).

TOKSYKOKINETYKA

Wchłanianie

3,7-Dimetylookta-2,6-dienal (cytral) może wchłaniać się do organizmu przez drogi oddechowe, przewód pokarmowy oraz skórę (brak danych ilościowych). Należy jednak zaznaczyć, że ze względu na właściwości fizykochemiczne cytralu (lotność), przez skórę wchłania się mniej niż 50% podanej dawki. Wielkość wchłaniania przez skórę jest skorelowana z wielkością dawki. Zależności takiej nie wykazano po narażeniu dożołądkowym (*Diliberto* i in. 1988). Nie ma danych ilościowych o wchłanianiu cytralu przez drogi oddechowe.

Rozmieszczenie

Badania rozmieszczenia 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu) przeprowadził *Diliberto* i in. (1988) na szczurach, samicach szczepu Fischer 344, którym [¹⁴C]-cytral podawano jednorazowo:

- dożołądkowo w dawkach: 5; 50 lub 500 mg/kg m.c.
- dożylnie w dawce 5 mg/kg
- na skórę w dawkach 5 lub 50 mg/kg.

Po 72 h od podania związku zwierzęta zabijano i pobierano tkanki do analizy poziomu radioaktywności węgla ¹⁴C. Eksperyment wykazał, że bez względu na sposób narażenia, poziom radioaktywności węgla ¹⁴C w tkankach nie przekraczał 2% całkowitej dawki. Największą radioaktywność odnotowano w: wątrobie, mięśniach, krwi, skórze oraz tkance tłuszczowej.

Metabolizm

Identyfikację metabolitów 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu) przeprowadzono w moczu uzyskanym od szczurów (samców szczepu F344) narażanych na [¹⁴C]-cytral podawany jednorazowo,

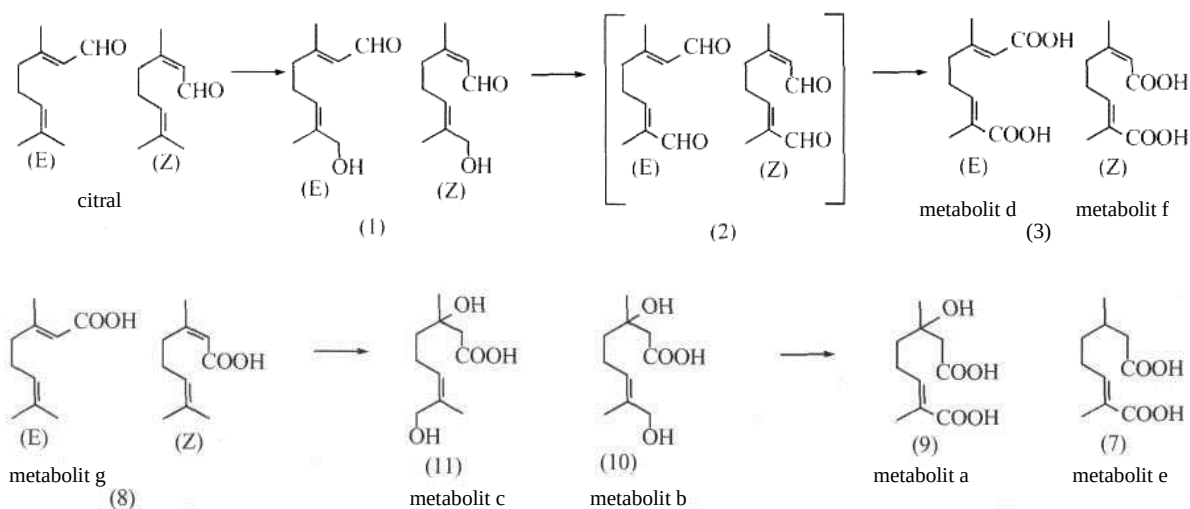
dożółdkowo w dawce 500 mg/kg masy ciała. Uzyskany w ciągu 24 h mocz poddano analizie techniką HPLC (Diliberto i in. 1990).

W moczu zidentyfikowano 7 metabolitów:

- kwas 3-hydroksy-3,7-dimetylo-6-oktadienowy
- kwas 3,8-dihydroksy-3,7-dimetylo-6-oktenowy
- kwas 3,9-dihydroksy-3,7-dimetylo-6-oktenowy
- kwas E i Z-3,7-dimetylo-2,6-oktadienodiowy
- kwas 3,7-dimetylo-6-oktadienowy
- kwas E-3,7-dimetylo-2,6-oktadienowy.

Pomimo obecności w budowie cytralu podwójnych wiązań, które są potencjalnym miejscem utleniania, żaden z metabolitów oznaczonych w moczu nie powstał z epoksydu oraz na drodze reakcji nukleofilowych z α,β -utlenionym aldehydem.

Proponowany przez autorów doświadczenia schemat metabolizmu cytralu przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Proponowany metabolizm cytralu (Diliberto i in. 1990): a – kwas 3-hydroksy-3,7-dimetylo-6-oktenowy; b – kwas 3,8-dihydroksy-3,7-dimetylo-6-oktenowy; c – kwas 3,9-dihydroksy-3,7-dimetylo-6-oktenowy; d – kwas E-3,7-dimetylo-2,6-oktadienodiowy; e – kwas 3,7-dimetylo-6-oktadienowy; f – kwas Z-3,7-dimetylo-2,6-oktadienodiowy; g – kwas E-3,7-dimetylo-2,6-oktadienowy

Proponowany metabolizm wiąże się z:

- redukcją lub hydratacją podwójnego wiązania
- oksydacją grupy aldehydowej
- oksydacją C-8 i prawdopodobnie C-9.

Na podstawie wyników badań metabolizmu w warunkach in vivo można przypuszczać, że główna droga przemian prowadząca do powstania odpowiednich kwasów zachodzi prawdopodobnie dzięki udziałowi dehydrogenaz aldehydowych.

Cytral jest mieszaniną dwóch izomerów: *cis* (neral) i *trans* (geranial). Na podstawie wyników badań wykazano, że oba izomery są inhibitorami ludzkiej dehydrogenazy aldehydowej (wszystkich trzech izoenzymów oznaczanych: E_1 , E_2 , E_3). Proces ten jest odwracalny w obecności NAD^+ . K_m (stężenie, przy którym szybkość metabolizmu wynosi połowę wartości maksymalnej) dla cytralu wynosiło odpowiednio: 4 $\mu\text{mol/min/mg}$ (E_1), 1 $\mu\text{mol/min/mg}$ (E_2), 0,1 $\mu\text{mol/min/mg}$ (E_3), $V_{\max}$ (maksymalna zdolność metaboliczna) wynosiła odpowiednio: 73 nmol/min/mg (E_1), 17 nmol/min/mg (E_2), 0,07 nmol/min/mg (E_3). Największa wartość $V_{\max}$ dotyczyła izoenzymu E_1 , co według auto-

rów sugeruje, że ten izoenzym jest wymagany w warunkach in vivo do metabolizmu cytralu (HSDB 2010).

Wydalanie

[^{14}C]-Cytral podawany dożołądkowo w dawce 5 mg/kg m.c. został wydany w ciągu 24 h w 67%. Dominowało wydalenie z moczem i tą drogą zostało wydane około 45% podanej dawki. Inne drogi wydalenia cytralu to: jako $^{14}\text{CO}_2$ z powietrzem wydechowym (16%) oraz poniżej 1% w postaci niezmienionej, z kałem (6%). Po 72 h zostało wydane około 80% podanej dawki: 51% z moczem, 17% jako $^{14}\text{CO}_2$ i około 1% jako związek niezmieniony z powietrzem wydechowym, 12% z kałem. W tkankach pozostało około 3% dawki. Profil wydalenia nie zmieniał się bez względu na wielkość podanej dawki.

Pomiar radioaktywności węgla ^{14}C po narażeniu szczurów na cytral podawany na skórę wykazał, że w ciągu 72 h zostało wydane odpowiednio średnio 19 i 29% podanej dawki (5 lub 50 mg/kg). Również w tym eksperymencie dominowało wydalenie związku z moczem, przy czym zależało ono od wielkości podanej dawki i wynosiło odpowiednio 9 i 17%.

Po narażeniu dożylnym (5 mg/kg) w ciągu 12 h z moczem zostało wydane 47% podanej dawki. Pozostałe drogi wydalenia to: powietrze wydychane 7% ($^{14}\text{CO}_2$) i kał (7%). W tkankach pozostało 6%.

Podsumowując, profil wydalenia [^{14}C]-cytralu był podobny bez względu na drogę podania. Różnice między wydaleniem z kałem po narażeniu dożołądkowym i dożylnym wskazują, że 5 ÷ 9% dawki podanej dożołądkowo nie zostało wchłonięte z przewodu pokarmowego i zostało wydane z kałem. Po narażeniu dermalnym radioaktywność ^{14}C we krwi i mięśniach była większa niż poziom obserwowany po narażeniu dożołądkowym i dożylnym. Po zastosowaniu tej drogi narażenia odnotowano zmianę w wydaleniu. Stosunek radioaktywności węgla ^{14}C między kałem lub wydychanym $^{14}\text{CO}_2$ a moczem wzrastał po narażeniu dermalnym w stosunku do narażenia dożołądkowego i dożylnego.

Podobne rezultaty uzyskali *Phillips i in.* (1976). Autorzy ci przeprowadzili doświadczenia na samcach myszy i szczurów, którym [^{14}C]-cytral podawano jednorazowo, dożołądkowo w dawkach: 100 (myszy); 5; 770 lub 960 mg/kg (szczury). U obu gatunków związek był szybko absorbowany z przewodu pokarmowego i wydany z organizmu w ciągu 72 h (szczury) i 120 h (myszy). Główną drogą wydalenia był mocz.

MECHANIZM DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

3,7-Dimetylookta-2,6-dienal (cytral) wykazuje działanie hemolityczne. Na podstawie wyników badań w warunkach in vitro przeprowadzonych z użyciem erytrocytów uzyskanych od szczurów wykazano, że bez względu na wielkość stężenia cytralu skutkiem jego działania na krew była hemoliza erytrocytów. Autorzy eksperymentu uważają, że mechanizm działania hemolitycznego cytralu zależy od jego stężenia – cytral o małym stężeniu działa głównie przez wolne rodniki, a o dużym stężeniu powoduje nadmierną utratę glutationu (*Tamir i in.* 1984; *Segal, Milo-Goldzweig* 1985).

DZIAŁANIE ŁĄCZNE

Kessler i in. (1998) przeprowadzili doświadczenie na szczurach Wistar, którym przez miesiąc podawali sam cytral lub w połączeniu z cyklosporyną A (CsA), lub z adjuwantem Freund'a (CFA). Celem eksperymentu było określenie wpływu immunomodulatorów na indukcję i stopień hyper-

plazji nabłonka prostaty u szczurów. Okazało się, że CsA znosiła zdolność cytralu do indukcji zmian hyperplastycznych lub zmniejszała rozmiar wysięku limfocytarnego w podścielisku. Natomiast skutkiem narażenia na cytral i adjuwant Freund'a było nasilenie zmian hyperplastycznych (HSDB 2010).

Connor (1991) wykazał, że cytral jest promotorem tworzenia, pod wpływem czynników kancerogennych, guza skóry u myszy. Powoduje też zahamowanie w skórze tworzenia z retinolu kwasu retinowego.

ZALEŻNOŚĆ SKUTKU TOKSYCZNEGO OD WIELKOŚCI NARAŻENIA

Zależność skutku toksycznego od wielkości narażenia w odniesieniu do zwierząt doświadczalnych omówiono w rozdziałach: „Działanie toksyczne na zwierzętach” i „Odległe skutki działania toksycznego” oraz przedstawiono w tabeli 2.

NAJWYŻSZE DOPUSZCZALNE STĘŻENIE W POWIETRZU ŚRODOWISKA PRACY

Istniejące wartości NDS i ich podstawy

W Polsce nie ustalono wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla cytralu. Na świecie wyłącznie higieniści amerykańscy ustalili wartość TLV-TWA dla frakcji aerozolu i par cytralu równą 32 mg/m^3 (5 ppm), (ACGIH 2010). Podstawą wyznaczenia tej wartości były zmiany obserwowane u szczurów narażanych na cytral inhalacyjnie (Gaworski i in. 1992). Eksperyment dotyczył ciężarnych (6. ÷ 15. dzień trwania ciąży) samic szczurów (Sprague-Dawley) narażanych na cytral przez 6 h dziennie o stężeniach: 0; 64 mg/m^3 (10 ppm) lub 217 mg/m^3 (34 ppm) w postaci par lub 435 mg/m^3 (68 ppm) jako mieszaniny aerozol/para. Stężenie 217 mg/m^3 (34 ppm) cytralu przyjęto za wartość NOAEL.

Za skutki krytyczne działania cytralu ACGIH wymienia: masę ciała, działanie drażniące na górne drogi oddechowe i działanie uszkodzające oczy. Ponadto zaliczono cytral do grupy A4, czyli do substancji nieklasyfikowanych jako czynniki rakotwórcze dla człowieka. Stosuje się również dla cytralu oznakowanie: substancja o działaniu drażniącym oraz substancja wchłaniająca się przez skórę (ACGIH 2010).

Podstawy proponowanej wartości NDS

Na podstawie przedstawionych w niniejszym opracowaniu wyników badań działania toksycznego 3,7-dimetylookta-2,6-dienalu (cytralu) należy stwierdzić, że związek ten cechuje mała toksyczność ostra. Cytral nie wykazuje również działania mutagennego, genotoksycznego oraz rakotwórczego.

Do ustalenia wartości NDS dla cytralu wykorzystano wyniki doświadczenia przeprowadzonego na szczurach przez Gaworskiego i in. (1992). Było to doświadczenie 10-dniowe, w którym na cytral o stężeniach: 0; 64 mg/m^3 (10 ppm) lub 217 mg/m^3 (34 ppm) jako para lub 435 mg/m^3 (68 ppm) jako mieszanina aerozol/para narażano inhalacyjnie ciężarne samice szczurów przez okres od 6. do 15. dnia trwania ciąży. Po narażeniu na cytral o największym stężeniu 435 mg/m^3 (68 ppm) u matek obserwowano: zmniejszenie przyrostu masy ciała, zmętnienie rogówki oka, trudności w oddychaniu oraz pojawienie się wydzieliny nosowej i ślinienie się. Zmiany te świadczyły o szkodliwym działaniu na matki związku w wyniku jego działania drażniącego (skutek krytyczny). Po narażeniu na związek o tym stężeniu stwierdzono również zmiany u płodów (nie-

znaczne zmniejszenie masy ciała, niewielki wzrost częstości występowania przypadków hipoplazji kości łędźwiowej i łonowej), których nie obserwowano o stężeniach mniejszych. Stężenie nieefektywne (NOAEC) wynosiło 217 mg/m³ (34 ppm).

Przyjmując tę wartość, proponowana wartość NDS cytralu będzie wynosiła:

$$NDS = \frac{NOAEL}{A \cdot B \cdot C \cdot D \cdot E} = \frac{217 \text{ mg/m}^3}{2 \cdot 2 \cdot 2 \cdot 1 \cdot 1} = \frac{217 \text{ mg/m}^3}{8} = 27 \text{ mg/m}^3,$$

gdzie:

A = 2 – współczynnik związany z różnicami wrażliwości osobniczej u ludzi,

B = 2 – różnice międzygatunkowe,

C = 2 – przejście z badań krótkoterminowych do przewlekłych (doświadczenie trwało 10 dni),

D = 1 – zastosowanie wartości NOAEC,

E = 1 – współczynnik modyfikacyjny.

Ze względu na działanie drażniące związku wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSCh) zaproponowano na poziomie 54 mg/m³ (2 · wartość NDS).

Na podstawie przedstawionych obliczeń proponujemy przyjęcie wartości NDS dla par cytralu na poziomie 27 mg/m³ i wartości NDSCh – na poziomie 54 mg/m³, a także oznakowanie związku literami: „I” – substancja o działaniu drażniącym oraz „A” – substancja o działaniu uczulającym.

Nie ma podstaw do ustalenia wartości dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym (DSB) cytralu.

ZAKRES BADAŃ WSTĘPNYCH I OKRESOWYCH, NARZĄDY (UKŁADY) KRYTYCZNE, PRZECIWWSKAZANIA LEKARSKIE DO ZATRUDNIENIA

dr n. med. EWA WĄGROWSKA-KOSKI

Instytut Medycyny Pracy

im. prof. dr. med. Jerzego Nofera

91-348 Łódź

ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8

Zakres badania wstępnego

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na skórę.

Badania pomocnicze: w zależności od wskazań diagnostyka w kierunku atopii.

Zakres badania okresowego

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na skórę. W zależności od wskazań badanie dermatologiczne.

Badania pomocnicze: w zależności od wskazań testy alergologiczne.

Częstotliwość badań okresowych: co 2 ÷ 4 lata.

U w a g a

Lekarz przeprowadzający badanie profilaktyczne może poszerzyć jego zakres o dodatkowe specjalistyczne badania lekarskie oraz badania pomocnicze, a także wyznaczyć krótszy termin następnego badania, jeżeli stwierdzi, że jest to niezbędne do prawidłowej oceny stanu zdrowia pracownika lub osoby przyjmowanej do pracy.

Zakres ostatniego badania okresowego przed zakończeniem aktywności zawodowej

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na skórę. W zależności od wskazań badanie dermatologiczne.

Badania pomocnicze: w zależności od wskazań testy alergologiczne.

Narządy (układy) krytyczne

Skóra.

Przeciwwskazania lekarskie do zatrudnienia

Nawrotowe zapalenie skóry o charakterze atopowego zapalenia skóry i wyprysku kontaktowego.

U w a g a

Wymienione przeciwwskazania dotyczą kandydatów do pracy.

O przeciwwskazaniach w przebiegu zatrudnienia powinien decydować lekarz sprawujący opiekę profilaktyczną, biorąc pod uwagę wielkość i okres trwania narażenia zawodowego oraz ocenę stopnia zaawansowania i dynamikę zmian chorobowych.

Ze względu na działanie uczulające, w badaniu podmiotowym należy uwzględnić wywiad w kierunku chorób alergicznych.

Zgodnie z odrębnymi przepisami nie wolno zatrudniać pracowników młodocianych w narażeniu na cytral.

PIŚMIENNICTWO

Abramovici A. (1972) The teratogenic effect of cosmetics constituents on the chick embryo. *Adv. Exp. Med. Biol.* 27, 161–174.

Abramovici A., Liban E., Ben-David E., Sandbank U. (1973) The ultrastructure of striated muscle in malformed chick limb induced by cytral. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* 14, 127–134.

ACGIH (2010) Documentation of the threshold limit values and biological exposures indices.

ChemID plus (2007) Cytral.

Connor M.J. (1991) Modulation of tumor promotion in mouse skin by the food additive cytral (3,7-dimethyl-2,6-oktadienal). *Cancer Lett.* 56, 25–28.

Dieter M.P., Goehl T.J., Jameson C.W., Elwell M.R., Hildebrandt P.K., Yuan J.H. (1993) Comparison of the toxicity of cytral in F344 rats and B6C3F₁ mice when administered by microencapsulation in feed or by corn-oil gavage. *Food Chem. Toxicol.* 31, 463–474.

Diliberto J.J., Usha G., Birnbaum L.S. (1988) Disposition of cytral in male Fischer rats. *Drug Metab. Dispos.* 16, 721–727.

Diliberto J.J., Srinivas P., Overstreet D., Usha G., Burka L.T., Birnbaum L.S. (1990) Metabolism of cytral, an α,β -unsaturated aldehyde, in male F344 rats. *Drug Metab. Dispos.* 18, 866–875.

Gaworski C.L., Vollmuth T.A., York R.G., Heck J.D., Aranyi C. (1992) Developmental toxicity evaluation of inhaled cytral in Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* 30, 269–275.

Gomes-Carneiro M.R., Felzenszwalb I., Paumgarten F.K.R. (1998) Mutagenicity testing of ($\pm$)-camphor, 1,8-cineole, cytral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.* 416, 129–136.

Hagan E.C., Hansen W.H., Fitzhugh O.G., Jenner P.M., Jones W.I., Taylor J.M., Long E.L., Nelson A.A., Brouwer J.B. (1967) Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. *Food Cosmet. Toxicol.* 5, 141–157.

Heydorn S., Menne T., Andersen K.E., Bruze M., Svedman C., White I.R., Basketter D.A. (2003) Cytral a fragrance allergen and irritant. *Contact Dermatitis* 49, 32–36.

HSDB, Hazardous Substances Data Bank (2010) Bethesda, National Library of Medicine.

IPCS (2008) Cytral.

Ishidate M., Sofuni T., Yoshikawa K., Hayashi M., Nohmi T., Sawada M., Matsuoka A. (1984) Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem. Toxicol.* 8, 623–636.

IUCLID (2000) International Uniform Chemical Information Database.

Jackson G.M., Hall D.E., Walker R. (1987) Comparison of the short-term hepatic effects of orally administered cytral in Long Evans hooded and Wistar albino rats. *Food Chem. Toxicol.* 25, 505–513.

Kessler O.J., Keisari Y., Servadio C., Abramovici A. (1998) Role of chronic inflammation in the promotion of prostatic hyperplasia in rats. *J. Urol.* 159, 1049–1053.

Lutz D., Eder E., Neudecker T., Henschler D. (1982) Structure-mutagenicity relationship in α,β -unsaturated carbonylic compounds and their corresponding allylic alcohols. *Mutat. Res.* 93, 305–315.

Noqueira A.C.M.A., Calvalho R.R., Souza C.A.M., Chahoud I., Paumgarten F.J.R. (1995) Study on the embryo-feto-toxicity of cytral in the rat. *Toxicology* 96, 105–113.

NTP (2003) NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of cytral (microencapsulated) (CAS No.5392-40-5) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (feed studies). NTP TR 505, January.

OECD, SIDS (2001) Initial assessment report for 13th SIAM. Cytral.

Opdyke D.L.J. (1979) Monographs on fragrance raw materials. Cytral. *Food Cosmet. Toxicol.* 17, 259–266.

Philips J.C., Kingsnorth J., Gangolli S.D., Gaunt I.F. (1976) Studies on the absorption, distribution and excretion of cytral in the rat and mouse. *Food Cosmet. Toxicol.* 14, 537–540.

Roffey S.J., Walker R., Gibson G.G. (1990) Hepatic peroxisomal and microsomal enzyme induction by cytral and linalool in rats. *Food Chem. Toxicol.* 28, 403–408.

Rothenberg H.W., Menne T., Sjolín K.E. (1977) Temperature dependent primary irritant dermatitis from lemon perfume. *Contact Dermatitis* 3, 37–48.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz.Urz. Unii Europejskiej z dnia 31 grudnia 2008 r. (L 353).

RTECS, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances Cincinnati (2010) National Institutes for Occupational Safety and Health.

Schnuch A., Uter W., Geier J., Lessmann H., Frosch P.J. (2007) Sensitization to 26 fragrances to be labelled according to current European regulation. *Contact Dermatitis* 57, 1–10.

Segal R., Milo-Goldzweig I. (1985) The hemolytic activity of cytral – II. Glutathione depletion in cytral treated erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 34, 4117–4119.

Servadio C., Abramovici A., Sandbank U., Savion M., Rosen M. (1986) Early stages of the pathogenesis of rat ventral prostate hyperplasia induced by cytral. *Eur. Urol.* 12, 195–200.

Steltenkamp R.J., Booman K.A., Dorsky J., King T.O., Rothenstein A.S., Schwoeppe E.A., Sedlak R.I., Smith T.H.F., Thompson G.R. (1980) Cytral. A survey of consumer patch-test sensitization. Food Cosmet. Toxicol. 18, 413–417.

Tamir I., Abramovici A., Milo-Goldzweig I., Segal R. (1984) The hemolytic activity of cytral: evidence for free radical participation. Biochem. Pharmacol. 33, 2945–2950.

The Merck index (2001) En encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. [Red. S. Budavari] 13. ed., Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New York, U.S.A.

Toaff M.E., Abramovici A., Sporn J., Liban E. (1979) Selective oocyte degeneration and impaired fertility in rats treated with the aliphatic monoterpene, cytral. J. Reprod. Fert. 55, 347–352.

Zeiger E., Anderson B., Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K., Speck W. (1987) *Salmonella* mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals. Environ. Mutagen. 9, 1–110.

JADWIGA A. SZYMAŃSKA, BARBARA FRYDRYCH

3,7-Dimethyl-2,6-octadienal (citral)

A b s t r a c t

3,7-Dimethyl-2,6-octadienal (citral CAS No. 5392-40-5) is a naturally aliphatic aldehyde of the terpene series and is an isomeric mixture of geranial and neral. It is the main component of lemon grass oil, which is found in all citrus fruits and used extensively in the food, cosmetic, and detergent industries. Citral is extracted from lemon grass oil by fractional distillation and also synthesized by oxidation of geraniol, nerol, or linalool. It is a mobile, pale yellow liquid with a strong lemon odor.

In the available literature there are no data on toxicity in humans. Citral is such a common allergenin hand eczema patients due to the combined effects of allergic and irritant properties.

Acute toxicity of citral is low in rodents because the oral or dermal LD₅₀ values are over 1000 mg/kg.

Seven bacterial reverse mutation studies indicate negative results with and without metabolic activation. An NTP study shows that there was no evidence of carcinogenic activity in male/female rats and male mice but some evidence of malignant lymphoma in female mice.

Citral is absorbed orally and fairly well absorbed dermally, considering its volatility. Citral is rapidly metabolized and excreted, with urine as the major route of elimination of citral-derived radioactivity.

The value of NOAEL is 217 mg/m³, based on the results of experiments on rats.

Based on these data the authors of this study propose the MAC (TWA) value for citral of 27 mg/m³, MAC (STEL) value of 54 mg/m³ and suggest additional notation: I – irritant substance, A – allergic substance.