SWECO VIAK Rapport 2008

Kombinationseffekter av föroreningar

Klient

Naturvårdsverket

Innehåll

Innehåll 3
Sammanfattning 5
English summary 8
Målsättning med arbetet 10
Organisation 10
Introduktion 11
Kemikalieblandningar i miljön 11
Kemikalieblandningar i lagstiftningen 14
Kemikalieblandningar retrospektivt 15
Strategier för riskbedömningen 16
Klassifikation av toxiciteten av kemikalieblandningar 17
Bottom-up perspektiv 17
Oberoende effekter (IA) 17
Fullständig positiv korrelation 18
Fullständig negativ korrelation 18
Ingen korrelation (Bliss-oberoende) 18
Koncentrationsaddition (CA) 18
Jämförelser mellan IA och CA 19
Kvantitativ relation mellan CA och IA 20
Predikterade värden av CA och IA för multikomponenta blandningar 20
Interaktioner 24
Farmakokinetiska modeller (PBPK) 26
Kvantitativa struktur-aktivitetsrelationer (QSAR) 26
Modeller för riskanalys av kemikalieblandningar 29
Faroindex 30
Point of departure index (PODI) 32
Exponeringsmarginal (MOE) 33
Toxisk ekvivalensfaktor (TEF) 33
Top-down perspektiv 34
Strategier för att utvärdera komplexa blandningar 35
Bedömning av hela blandningar 35
Bioassay-riktad fraktionering och 36
fraktionering av blandningen och rekombination 36
Spikning av komplexa blandningar med individuella komponenter 36
”Lumping” 36
Topp-10-ansats 37
Kemiskt fingeravtryck kombinerat med multivariat effektanalys 37
Varianter på temat tillräckligt likt det komplexa 38

Prioriterade blandningar 38
Metoder som används av internationella organisationer 40
United Kingdom Environmental Agency (UKEA) 40
United States Environmental Protection Agency (EPA) 42
Australien och Nya Zeeland 43
Svenska och europeiska myndigheters bedömning av kombinationseffekter 44
Arbetsmiljöverket 44
Kemikalieinspektionen 45
Europakommissionen och Europaparlamentet 45
Resultat från representativa exprimentella studier 46
Erfarenhet av bedömning av vanliga grupper av kemikalier 48
Metaller 48
Biocider 48
Tensider 49
Dioxiner 50
PCB 50
PAH 50
Hormonstörande kemiska blandningar 51
Slutsatser och rekommendationer 53
Handlingsplan 56
Bilagor 58
Bilaga 1 59
Bilaga 2 60
Bilaga 3 61
Referenser 62

Sammanfattning

I de allra flesta miljöer, med undantag för de laboratoriekosmos där toxicitetstester utförs, förekommer toxiska kemikalier tillsammans med andra, mer eller mindre toxiska kemikalier, och tillsammans med andra stressfaktorer, såsom patogener och predatorer. Frågan om det gör någon skillnad för den organism, som exponeras för en toxisk kemikalie, att den samtidigt exponeras för andra toxiska kemikalier väcktes på allvar i slutet av 1970-talet, och tester med i huvudsak binära blandningar visade att annat än kombinationseffekter var svårfunna undantag. Det stod emellertid klart att det finns åtminstone praktiska hinder för att testa toxiciteten för alla tänkbara kombinationer av kemikalier – en utvärdering av t.ex. alla kombinationer av 10 ämnen skulle kräva minst 1000 tester. I stället har forskare utvecklat olika beräkningsmodeller för toxiciteten av kombinationer av kemikalier.

Den här rapporten redovisar de vanligaste modellerna för att klassificera och beräkna toxiciteten av kemikalieblandningar, vilka antaganden modellerna bygger på, vilka styrkor och svagheter de har. Till dessa modeller räknas sådana som utgår från att a) kemikalierna är funktionellt oberoende, eller att de b) har samma verkningsmekanism, påverkar samma struktur eller funktion, eller har likartad kemisk struktur, eller att de c) interagerar med varandra genom synergier eller antagonism. Fysiologiskt baserade farmakokinetiska (PBPK) modeller är ett annat verktyg för att beskriva omsättning och toxiska mekanismer för kemikalier i blandningar. Även modeller som bygger på kvantitativa relationer mellan kemisk struktur och toxisk effekt (QSAR) har utvecklats för att förutsäga toxiciteten av en blandning vars komponenter man känner och kan representera med översiktliga kemiska egenskaper, såsom hydrofobicitet. I omfattande litteraturgenomgångar har man funnit att 75-80 % av binära, tertiära och kvartära blandningar har koncentrationsadditiva egenskaper, vilket innebär att deras bidrag till blandningens toxicitet står i proportion till deras koncentration.

Om blandningarna är komplexa och innehåller många okända ämnen från t.ex. avgaser och avlopp föreslår rapporten ett antal strategier. Den enklaste är att testa hela blandningens toxicitet vid olika koncentrationer, men ibland är det omöjligt för att den innehåller en eller flera starkt toxiska komponenter. Man kan fraktionera blandningen i olika steg, kombinera fraktioner och testa toxiciteten av fraktionerna, man kan försöka identifiera de 10 mest riskabla komponenterna i blandningen, testa deras samlade toxicitet och anta att den är representativ för hela blandningen, och man kan kombinera kemisk identifikation med multivariat effektanalys.

Eftersom det finns ett kolossalt stort antal kemiska blandningar i miljön är det viktigt att utveckla kriterier för att prioritera de blandningar som är viktigast att analysera och bedöma. Rapporten ger exempel på sådana blandningar, som har likartade komponenter, sådana som har definierad och förutsägbar sammansättning, och sådana som uppträder tillfälligt.

Olika index används för att sammanfatta risken för att en kemikalieblandning har en toxicitet som inte anses acceptabel. Index utgår från att man beräknar kvoten mellan exponeringsnivån för en komponent och den koncentration som anses som ett officiellt och säkert gränsvärde eller den koncentration som i ett experiment svarar mot ett visst lågt percentilvärde för en lägsta effekt av kemikalien. Kvoterna för de olika komponenterna adderas, och risken definieras som en sannolikhet att den summerade kvoten överstiger ett visst värde. Till sådana index räknas FI (faroindex), PODI (point of departure), MOE (margins of exposure) och TEF (toxic equivalency factor). Index är ett rationellt och transparent sätt att sammanfatta en mängd data om kemikalieblandningar men representerar samtidigt bara en punktskattning av ett dos-effektsamband och tar ingen hänsyn till den osäkerhet som finns i primärdata. Vissa index använder dessutom effektvärden för komponenterna som är dekorerade med en officiell säkerhetsfaktor, som döljer den verkliga osäkerheten och som blåser upp blandningens riskosäkerhet till orimliga proportioner.

I några avsnitt av rapporten redovisas vilka rekommendationer en del internationella och nationella organisationer och myndigheter ger för beräkning och bedömning av toxicitet och risker med kemikalieblandningar. Det är uppenbart att metodutveckling inom området tillhör prioriterade ärenden inom flera länder och organisationer.

Avslutningsvis rekommenderar rapporten den som ska bedöma toxiska risker med kemikalie-blandningar att följa ett analysschema som bifogas i bilagor med olika upplösningsgrad. Analysschemat guidar bedömaren genom de olika steg och beräkningsmodeller som kan appliceras beroende på hur väl man känner sammansättningen av blandningen.

Rapporten lägger också fram ett förslag till handlingsplan för Naturvårdsverkets hantering av kemikalieblandningars toxicitet. Vi rekommenderar primärt verket att verka för att alla kemikaliebedömningar görs med utgångspunkt från att en kemikalie ingår som en komponent i en blandning och att det är blandningens toxicitet som ska beräknas i första hand och inte den enskilda komponentens. Vidare rekommenderar vi verket att ordna utbildning och träning i riskbedömning av kemikalieblandningar, att formalisera en stödjande expertgrupp för komplicerade bedömningar, att låta utarbeta en manual och handledning för

bedömning av blandningseffekter, att ge forskarsamhället i uppdrag att modernisera och kvalificera riskanalysmetoder för kemikalieblandningar och att låta göra detaljanalyser av kombinationseffekter av grupper av strukturellt heterogena kemikalier, t.ex. läkemedels-substanser.

English summary

This report addresses the challenges associated with the calculation of the toxicity of mixtures of chemicals and the estimation of environmental and health risks of those mixtures. It is obvious that practical limitations precludes toxicity testing of all possible combinations of chemicals and concentrations – for instance, testing the toxicity of all combinations of only 10 individual chemicals would require at least 1000 separate assays. As an alternative, the evaluation of mixture toxicity and risk is based on mathematical and statistical modelling.

The reader is introduced to the most common models to classify and calculate mixture toxicity. Included are models assuming that 1) the chemicals act independently of each other in the organisms; 2) the chemicals have the same mechanism of toxicity, affect the same endpoint, or have the same chemical structure; 3) the chemicals interact with each other in synergistic or antagonistic ways. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models describing metabolism and toxicity of mixtures are briefly presented, and new approaches to use quantitative structure-activity relationships (QSAR) to estimate toxicity of mixtures from predicted chemical characteristics of the mixtures are reviewed. Reviews of the scientific literature shows that the toxicity of 75-80 % of known mixtures of two to four chemicals can be safely calculated by concentration addition, which means that the contribution of each component to the mixture toxicity is proportional to its concentration in the mixture.

Schematic decision trees are constructed in the report to help the assessor to evaluate the toxicity and risk of complex mixtures of more or less unknown composition. Whole mixture toxicity test at different concentrations is the simplest approach, although sometimes cumbersome if one or several components are very toxic. Mixtures can be fractionated based on successive bioassays, fractionated and recombined, fractionated in combination with identification and toxicity testing of the 10 most risky components, and chemically identified in combination with a multivariate effects analysis. Since the number of complex mixtures in the environment is just formidable, the report reviews efforts to develop criteria to prioritise among them and presents list of prioritised mixtures containing similar components, mixtures of known and predictable composition, and mixtures of occasional composition or appearance.

The environmental and health risk of mixtures is often expressed by an index by which the exposure to an individual component is compared to a guideline or regulatory value of the

component or to a specific percentile value of the lowest effect level for the component in a dos-response assay. The ratios for the individual components are added to a mixture index, and the risk is estimated as a probability that the mixture index exceeds a specific value. The report presents some common risk indices, viz. HI (hazardous index), PODI (point of departure index), MOE (margins of exposure), and TEF (toxic equivalency factor).

The common practices of mixture toxicity and risk assessment by a number of national and international organisations are briefly reviewed, as well as the legal bases of mixture toxicity assessment in Sweden. The current knowledge about assessment methodology of certain common groups of chemicals, such as metals, biocides, detergents, dioxines, PAHs, and endocrine disruptors, is summarized, and a commented list of representative scientific publications of mixture studies is included in the report.

The authors recommend the Environmental Protection Board to encourage the application of mixture toxicity and risk assessment methodology to all kinds of chemical mixtures and all kinds of environments where chemicals will appear in mixtures. To achieve this, a training and educational programme on risk assessment of chemical mixtures should be established, as well as a group of supporting experts advising on complex cases. A manual for mixture toxicity and risk assessment should be prepared; the board may initiate some steps towards a focussed research programme on analyses of risks of complex mixtures; and the board may request evaluations of combination effects of groups of chemicals that are structurally heterogeneous, such as endocrine disruptors.

Målsättning med arbetet

Denna rapport har tagits fram på uppdrag av Naturvårdsverket. Målsättningen är att gå igenom och bedöma den internationella litteraturen och praxis vad gäller värdering av miljö- och hälsoeffekter av blandningar av föroreningar, med syftet att ge ett stöd åt Naturvårdsverket, länsstyrelser, m fl i föroreningsärenden och att ge ett underlag för en praktiskt inriktad bedömningsmanual.

Organisation

Göran Bengtsson har varit uppdragsledare hos SWECO VIAK. Göran Bengtsson och Johan Holmqvist har skrivit rapporten.

Introduktion

Medan uppskattningsvis mer än 95 % av de resurser som finns för att bestämma kemiska ämnens toxicitet används för studier av enskilda ämnen (Yang, 1994), exponeras inre och yttre miljö kontinuerligt eller episodiskt, akut eller kroniskt, för blandningar av kemikalier, ofta av okänd sammansättning, i låga doser och från flera källor och exponeringsvägar samtidigt. Även om mera av resurserna i stället användes för att testa kemikalieblandningar, skulle det i praktiken vara omöjligt att få fullständig information om effekterna av olika blandningar och olika doser på olika organismer och deras egenskaper, eftersom antalet tester ökar exponentiellt med antalet kemikalier i en blandning. Om man t.ex. ska testa toxiciteten av alla kombinationer av 10, 20 och 30 kemikalier vid bara en dos och för en egenskap behövs 1024 (2^{10}), 1 048 575 (2^{20}) och 1073 741 824 (2^{30}) tester. Riskbedömningens främsta utmaning blir då att finna former och metodik med vilka data från enskilda kemikalier kan användas för att förutsäga potentiella miljö- och hälsorisker vid exponering för blandningar av kemikalier. I en sådan metodik ska man kunna få stöd för att hantera risker för en organism som exponeras för blandningar av kemikalier med lika eller olika egenskaper, som påverkar samma eller olika organ och funktion, som uppträder i samma, höga eller låga, dos eller i mycket varierade doser, som uppträder samtidigt kontinuerligt, eller med vissa komponenter kontinuerligt och andra episodiskt.

Den här rapporten sammanfattar det internationella forskarsamhällets och miljömyndigheters kunskapsstöd och förhållning till dessa och andra frågor om toxicitet av kemikalie-blandningar. Den avslutas med ett antal förslag för att förbättra stödet för beslut och åtgärder om riskhantering av kemikalieblandningar.

Kemikalieblandningar i miljön

Giftiga kemikalieblandningar sprids i miljön i samband med olyckor (bränder, transport med bil, båt, tåg, haverier i anläggningar), via avloppsvatten och via avrinning från jordbruksmark och urbana ytor. Flera screening- och övervakningsundersökningar av sjöar, kustvatten och ytvattendrag har visat att recipienter idag är belastade, i varierande grad, av en mångfald av olika kemiska ämnen med varierande ekotoxikologiska egenskaper.

Kemiska blandningar förekommer i stort sett i alla antropogena miljöer. Specifika miljöer där människor, djur och växter exponeras för ett stort antal av olika kemiska ämnen är deponier, tätortsmiljöer, områden omkring förbränningsanläggningar, återvinnings-anläggningar såsom batteri- och elektronik-återvinning, träbehandlingsanläggningar, diverse tillverkningsindustrier, gruvbrytning och smältverk (Hansen et al., 1998). En lista med exempel på arbetsplatser där man kan utsättas för exponering av kemiska blandningar redovisas i Tabell 1 (Sexton och Hattis, 2007). I Tabell 2 redovisas ämnen som ingår i kemiska blandningar på arbetsplatser. Kemiska blandningar kan även förekomma i varuhus, jordbruk och till och med inomhusmiljöer där människor utsätts för direkta och diffusa emissioner från möbler, byggkemikalier, golv- och väggbeklädnad samt inredningsartiklar.

Tabell 1. Exempel på verksamheter där exponering för kemikalieblandningar kan uppträda **(Tarcher, 1992).**

Sysselsättning eller aktivitet
Jordbruk och kontroll av skadegörare
Bil/flygplanstillverkning och reparation
Bagare, livsmedelshantering
Underhåll av byggnader & fasadputsning
Krukmakeri & murning
Snickeri, träarbete & timmerindustri
Kemikalieindustri
Byggnads- och rivningsarbete & vägarbete
Kemtvättning & tvättinrättning
Elektronikarbete,
Brandsläckning
Gjuteriarbete
Hälsovårdsarbete, laboratoriearbete, tandlagning
Maskineri, slipning & metallarbete
Gruvbrytning (framförallt underjordisk)
Olja & petrokemiskt arbete
Pappersindustri
Framställning av plast & plastprodukter
Rörmokeri/blygjutning)
Tryckning & litografiering
Sandblästring & sparymålning
Textilindustri
Svetsning

Förutom kemiska föreningar utsätts vi kontinuerligt för en mångfald av olika stress-faktorer både i inomhus- och utomhusmiljön. Detta innebär att den kemiska blandningen är endast en del av det totala exponerings-scenariet som skall beaktas vid utvärdering av effekten av exponeringen för ett eller flera ämnen. I Tabell 3 redovisas kategorier av faktorer som kan vara en del av den samlade exponering i en inomhusmiljö.

Utöver de miljöer där människor utsätts för en kontinuerlig exponering av kemiska blandningar exponeras vi också från ett flertal punktkällor. Några av de viktigaste källorna är farmakologiska preparat, kosmetologiska- och hygienprodukter, olika typer av animaliska livsmedel samt dricksvatten. Dricksvattnet kan vara påverkat från ett flertal olika källor. Grundvatten kan exempelvis vara påverkat av biocider från jord- och skogsbruk, naturligt och

antropogena ”hots spots” av tungmetaller samt organiska substanser från områden med förorenad mark. Ytvatten som används som dricksvattentäkter kan påverkas via exempelvis ytavrinning och deposition. Även vid vattenverken tillsätts olika kemikalier för att reducera mängden patogena organismer.

Vi utsätts också direkt via inandningsluften för olika komplexa kemiska föreningar och ämnen som uppkommit vid förbränningsreaktioner främst i transport- och uppvärmningssektorn.

Tabell 2. Kategorier av potentiellt farliga ämnen i kemiska blandningar i yrkesmiljöer (industriella miljöer) enligt Tarcher (1992)

Aerosoler, Ångor, Gaser		**Metaller, Metallrök**	
kolmonoxid	fosgen	aluminium	järn
formaldehyd	rök	arsenik	bly
vätesulfid	avloppsgaser	kadmium	kvicksilver
etenoxid	svaveldioxid	krom	nickel
kväveoxid	ädelgaser	kobolt	
ozon	svetsningsrök		
dieselavgaser	förbränningsbiprodukter		
Biologiska inhalationsmedel		**Organiskt damm**	
bakterie	svampar	bomullsdamm	virkesdamm
mögel	sporer	giftek	
Frätande ämnen		**Petrokemiska produkter**	
syror	alkalier (alkalimetaller)	asfalt	tjära
ammonium	klor	kreosot	koltjära
fenol		PBB, PCB	petroleumdestillat
Färger, Färgämnen		**Fysikaliska agenter**	
anilinfärger	azofärgämnen	tunga lyft	ljud/oväsen
bensidin		termiskt tryck	vibration
Explosiva komponenter		**Plaster**	
nitroorganiska ämnen (t.ex. TNT)		vinylklorid	hartser
perklorat		akrylnitril	polystyren
Oorganiskt damm, Pulver		**Sensibiliserande agenter**	
asbest	beryllium	alifatiska aminer	nickel
koldamm	glasfiber	toluendiisocyanat	platina
talk	kiseldioxid	sexvärdigt/hexavalent krom	

Insekticider, Herbicider		Lösningsmedel	
karbamater/uretaner/ estrar av karbamidsyra	halogenerade HC	bensen	koldisulfid
organofosfater	fenoxiherbicider	koltetraklorid	kloroform
		metanol	perkloreten
Jonisera/Icke-joniserande strålning		trikloreten	xylen
röntgen		glykoleter	toluen
EM-strålning			

De flesta kemikalier i miljön uppträder i koncentrationer som är mycket lägre än den genomsnittliga effektkoncentrationen (EC_{50}), möjligen också i lägre koncentrationer än de individuella NOEC-värdena. Trots det kan de bidra till toxiska effekter genom olika kombinationseffekter. Vanligtvis tar miljö- och hälsomyndigheter hänsyn till potentiella blandningseffekter via olika säkerhets- och bedömningsfaktorer, medan toxicitetstester är begränsade till de individuella kemikalierna.

Kemikalieblandningar i lagstiftningen

I svensk miljö- och kemikalielagstiftning förekommer begrepp såsom kombinationseffekter, synergi, växelverkan i mycket begränsad omfattning. I förordningen om miljökvalitetsnormer för fisk- och musselvatten står det dock att ”Metallers synergieffekter skall beaktas” (Riksdagen, 2001).

Toxiciteten av kemiska blandningar uppmärksammas i europeisk lagstiftning, men hanteras på ett godtyckligt sätt, genom användning av säkerhetsfaktorer, vanligtvis en faktor 10 (The ACE Project, 2007).

I EU:s nya kemikalielagstiftning REACH och samfundets nya lagstiftning avseende klassificering och märkning GHS (Globalt Harmoniseringssystem) hanteras toxiciteten av blandningar av kemiska ämnen genom farlighetsfrasen för den specifika kemiska produkten. Emellertid tas endast hänsyn till additionsprincipen.

Kemikalieblandningar retrospektivt

Toxiska effekter av kemikalieblandningar har testats experimentellt i huvudsak sedan slutet av 1970-talet. Fram till mitten av 1980-talet gjordes de flesta observationer på binära blandningar (Yang och Rauckman, 1987), men det förekom enstaka studier av blandningar med 10 eller fler kemikalier och av komplexa blandningar från deponier, förbrännings-anläggningar, drivmedel och förorenade vattenprover (Yang et al., 2004). Under mitten av 1980-talet utvecklades ny metodik inom bl.a. analytisk kemi, genetisk toxikologi och reproduktionstoxikologi anpassad för låga halter av komplexa kemikalieblandningar, och man kunde bl.a. konstatera cytogenetiska effekter av kemikalieblandningar vid lägre komponent-koncentrationer än vad som var möjligt med de individuella kemikalierna (t. ex. Kligerman et al., 1993). Under 1990-talet har kunskapen om effekter av kemikalieblandningar byggts på fler källor av mekaniskt baserad information, inte minst genom integration med fysiologiskt baserade farmakokinetiska (PBPK) modeller. Dessa har utvecklats för att kunna tillämpas på alla typer av komplexa blandningar, under förutsättning att det finns kvantitativ information om den metaboliska omsättningen av de individuella kemikalierna och om interaktionen mellan dem parvis.

Tabell 3. Kategorier av ämnen som kan uppträda i blandningar i inomhusmiljö (Sexton och Hattis, 2007)

Aerosoler, Ångor, Gaser	
VOC (t.ex. bensen, styren, toluen, formaldehyd, kloroform, xylen) Kokning och upphettning av biprodukter från förbränning av bränsle (t.ex. CO, CO_2, NO_2, BAP) Tobaksrök (innehåller tusentals enskilda föreningar) Infiltration av utomhusluft innehållande luftföroreningar (t.ex. avgaser och industriella luftutsläpp) Husdamm (t.ex. biologiska och kemiska föreningar av aerosoler)	
Biologiska inhalationsmedel (luftallergener och patogener via luft)	
Insekter och andra artropoder, inklusive utsöndringar och kroppsdelar (t.ex. kvalster, kackerlackor) Bakterie (t.ex. Staphylococcus aureus, Salmonella typhosa) Svamp (t.ex. Aspergillus niger, Penicillium funiculosum) Sällskapsdjur (t.ex. katter, hundar, hamstrar, kaniner) Jästsvampar (t.ex. Saccharomyces cerevisae, Candida albicans)	
Dammpartiklar, Fiber	**Metaller**
Asbestfiber Mineral- och glasfiber Husdamm	Arsenik Bly Kadmium Krom
Insekticider, Fungicider, Herbicider	**Fysikaliska faktorer**
Karbamater/uretaner/estrar av karbamidsyra Fosfatföreningar Halogenerade kolväten Fenoxiherbicider	Ljud/oväsen Belysning Termiskt tryck Ergonomi Fuktighet
Jonisera/Icke-joniserande strålning	**Odörer**
Radon och radondöttrar Elektromagnetisk strålning	Matlagning Konsumtionsvaror Sällskapsdjur Människor Avfall
Psykosociala stressorer	
Trängsel Fattigdom Familjeproblem	

Strategier för riskbedömningen

En riskbedömning som omfattar blandningar av toxiska kemikalier måste hantera de speciella utmaningar som följer av att flera kemikalier är närvarande samtidigt i ett system genom att:

1. utveckla ett grundläggande klassifikationssystem för interaktioner mellan kemikalierna, såsom additiv, synergistisk och antagonistisk effekt.

2. utnyttja kunskap om hur absorption, fördelning, metabolism och exkretion av kemikalierna kontrollerar interaktionerna, eftersom en kemikalie kan påverka transporten av en annan till det ställe där toxiciteten utlöses liksom hur omfattande den toxiska reaktionen blir.

3. utveckla en metodik, t.ex. i form av beslutsträd, för att analysera och prioritera mellan toxiska effekter av mer eller mindre komplexa blandningar.

Utmaningarna kan hanteras i en strategi som nalkas riskbedömningen från ett bottom-up eller top-down perspektiv. I ett bottom-up perspektiv används antingen toxicitetsdata eller grundläggande kunskaper om de individuella kemikaliernas transport, omsättning och verkningsmekanismer i en organism för att beräkna kemikaliens bidrag till toxiciteten av den blandning den ingår i. Ett top-down perspektiv utgår från en mer eller mindre komplex och till sammansättningen mer eller mindre okänd blandning av kemikalier för vilken organismen eller det skyddsvärda systemet exponeras. Toxiciteten av en sådan blandning kan bestämmas i ett schema av tester på hela och delar av blandningen.

Klassifikation av toxiciteten av kemikalie-blandningar

Bottom-up perspektiv

Grunderna för klassifikationen av toxiciteten av kemikalieblandningar är i huvudsak desamma som formulerades för drygt 60 år sedan (Bliss, 1939; Loewe och Muischnek, 1926; Plackett och S., 1948). I princip kan man särskilja tre huvudgrupper av effekter av kombinationer av kemikalier, nämligen **oberoende**, **likartade** och **interaktioner**.

Oberoende effekter (IA)

Kemikalier vars effekt inte påverkas av närvaron av andra kemikalier har ofta andra verkningsmekanismer och bindningsställen/måltavlor för den toxiska effekten än övriga kemikalier i blandningen (eng. ”independent action”, IA). Oberoendet innebär att två eller flera kemikalier är funktionellt oberoende, så att den stegvis ökade effekten av en kemikalie inte påverkas av närvaron av en annan, d.v.s. att organismen eller funktionen som testas svarar på kemikalie A såsom om B inte var närvarande. Man kan föreställa sig att de organismer eller funktioner som är känsligast för kemikalie A också är känsligast för kemikalie B, alltså att känsligheterna är fullständigt och positivt korrelerade, låt vara att kemikalierna är funktionellt oberoende. Man kan också föreställa sig att den som är känsligast för kemikalie A är okänsligast för kemikalie B (känsligheterna negativt korrelerade), eller att känsligheterna för de två kemikalierna är statistiskt oberoende. De möjligheterna kan sammanfattas i tre fall av oberoenden.

Fullständig positiv korrelation

Sannolikheten för en effekt av den kemiska blandningen, som med sannolikheten P_A och P_B ger en effekt av kemikalie A och B individuellt, är lika stor som responsen till det mest toxiska ämnet i blandningen: $P_{mixture\ A,B} = P_A$ om toxiciteten A >B. Om en viss dos av kemikalie A förväntas påverka 30 % av testorganismerna och kemikalie B förväntas påverka 14 % av dem, blir den förväntade påverkan av blandningen 30 %.

Fullständig negativ korrelation

Om känsligheten för de två kemikalierna i blandningen är helt negativ, kommer den förväntade påverkan av blandningen att bli additiv (30 + 14 = 44 %), så länge sannolikheten för den totala påverkan av de två kemikalierna är mindre än 1.0: $P_{mixture\ A,B} = P_A + P_B \leq 1$.

Ingen korrelation (Bliss-oberoende)

För den händelse att känsligheten för de två kemikalierna är helt oberoende av varandra, t.ex. då vissa organismer är okänsliga för kemikalie A men känsliga för kemikalie B, kommer sannolikheten för påverkan av blandningen att vara lika med summan av sannolikheterna för att organismerna påverkas av de individuella kemikalierna, under förutsättning att de som påverkas av A inte påverkas av B:

$$P_{mixture\ A,B} = P_A + P_B - P_A P_B$$

Med samma påverkansresultat som tidigare kan man se att det här fallet är ett mellanting av de två övriga: $P_{mixture\ A,B} = 100(0.30 + 0.14 – (0.30 \times 0.14)) = 39.8$ %.

Koncentrationsaddition (CA)

Kemikalier som inte påverkar varandras toxicitet i en blandning utan vars bidrag till blandningens toxicitet står i proportion till deras dosandel i blandningen sägs ha likartad effekt. Den klassificeringen baseras på att de ingående ämnena i kemikalieblandningen har en gemensam eller liknande verkningsmekanism och att de inte interagerar med varandra utan representerar anrikningar eller utspädningar av varandra. Eftersom kemikalierna i den här huvudgruppen är utbytbara mot varandra och verkar i proportion till sin koncentration i blandningen, kallas beräkningen av toxiciteten för koncentrationsaddition (eng.

”concentration addition”, CA) (Loewe och Muischnek, 1926). Om man, via tester, har data för den effektkoncentration EC av en kemikalie *i* som ger en viss procentuell effekt *x* på en egenskap eller funktion (exempelvis en 25%-ig, EC_{25}, dödlighet, immobilisering, nedsättning av reproduktion), kan man summera de enskilda kemikaliernas toxicitet till blandningens som

$$\sum_{i=1}^{n} \frac{c_i}{ECx_i} = 1$$

där *n* är antalet kemikalier och c_i är deras koncentration i blandningen. Om summan av komponenternas toxicitet blir mindre än 1 har deras doser mer än additiv effekt, och om summan blir större än ett har komponenterna mindre än additiv effekt.

Till kemikalier som verkar specifikt, har likartad verkningsmekanism och ansluter till koncentrationsadditionsmetoden hör triaziner (Backhaus et al., 2000), dioxinliknande ämnen (Van den Berg et al., 1998), hormonstörande ämnen (Payne et al., 2001; Rajapakse et al., 2001) och polyaromater (PAHs) (Fent och Bätscher, 2000).

Jämförelser mellan IA och CA

Sorteringen av kemikalier i de två huvudgrupperna oberoende och likartade effekter bjuder på en del utmaningar. Kandideringen till gruppen likartade vilar på en prövning av vilken verkningsmekanism eller verkningstyp (mode of action) som kemikalien kan hänföras till. Det kräver detaljerad kunskap om molekylära reaktioner i en organism från absorptionen av en dos till responsen i ett visst organ (verkningsmekanism) eller om typen av respons eller de kritiska stegen i en respons (verkningstyp). Varken den vetenskapliga litteraturen eller undervisningslitteratur i toxikologi har nått konsensus om innebörden i konceptet likartad effekt, och myndigheter är vacklande eller inkonsistenta i föreslagna bedömningsgrunder. Sålunda kräver EPA en fullständig karakterisering av verkningsmekanismer (t ex detaljerad farmakodynamisk karakterisering) för riskbedömning av cancerogena ämnen (U.S. Environmental Protection Agency, 2000), belägg för samma toxiska effekt via samma huvudsakliga biokemiska mönster för icke-cancerogena ämnen men belägg för att den egenskap eller funktion (måltavlan, target organ) som påverkas av en blandning är likartad (U.S. Environmental Protection Agency, 2000). Ingen av de tre kriterierna ger en övertygande prediktion av koncentrationsaddition för toxiciteten av kemikalieblandningar (Borgert et al., 2004), möjligen för att kriterierna baseras på verkningsmekanismer för de enskilda komponenterna snarare än för komponenterna i blandningar. Ändå finns det en hel

del empiriskt stöd för användningen av koncentrationsaddition för att beräkna toxiciteten av en del typer av blandningar (se tabell 5). För läkemedelssubstanser finns ofta detaljerad information om verkningsmekanismer, men med undantag av några få grupper, såsom fosfororganiska och karbamatbaserade insekticider, saknas sådan information om bekämpningsmedel. I praktiken är man därför hänvisad till att använda information om strukturella likheter mellan komponenter och om deras toxicitet för samma organ och funktion för att avgöra om komponenterna är likartade. Dessvärre finns det många undantag till regeln att kemikalier med likartad molekylär verkningsmekanism ger likartade toxiska effekter (Mileson et al., 1998).

Kvantitativ relation mellan CA och IA

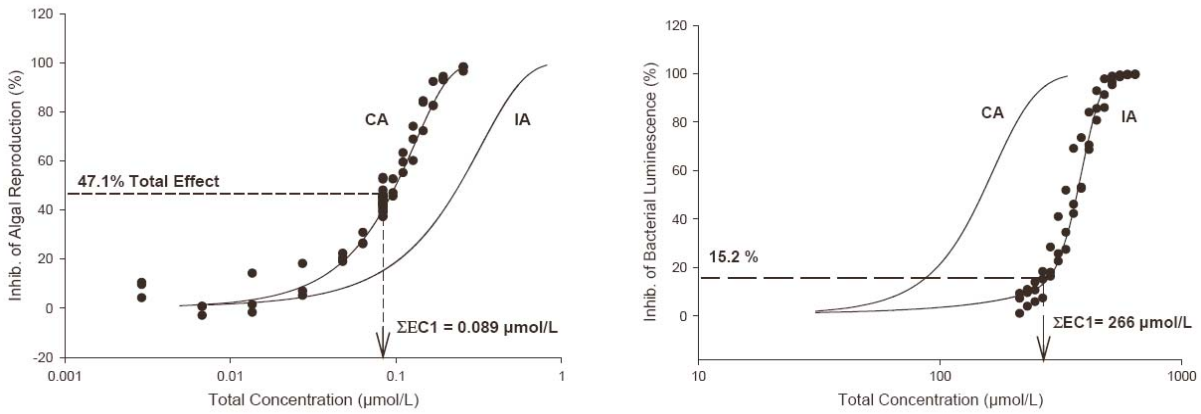
Den kvantitativa relationen mellan CA och IA med avseende på den uppskattade toxiciteten för den kemiska blandningen har undersökts i ett flertal studier. Drescher och Boedeker (1995) visade att relationen mellan CA och IA kan variera beroende på olika faktorer såsom hur branta koncentrations-responskurvorna är, vilken regressionsmodell som används vid beräkningen, den valda effektnivån och koncentrationsförhållandet i blandningen. För multikomponenta blandningar har Faust (2001), lagt till en uppgift om betydelsen av antalet komponenter, baserat på observationer av Faust (1999). Denne visade att förhållandet mellan effektkoncentrationen för en given effektnivå x uppskattad med IA (ECx_{IA}) och effektkoncentrationen uppskattad för CA för samma effektnivå CA (ECx_{CA}) alltid är lika eller lägre än antalet komponenter n i den kemiska blandningen. I de fall där CA ger ett högre toxicitetsvärde för den kemiska blandningen än IA kommer den kvantitativa differensen maximalt att uppgå till n. I det motsatta fallet, då IA predikterar en högre toxicitet än CA, finns ingen övre teoretisk gräns.

Predikterade värden av CA och IA för multikomponenta blandningar

Både CA och IA har visat sig kunna ge rimliga prediktioner för toxiciteten av kemiska blandningar. Under 1980- och 90-talet beräknades blandningstoxiciteten av flera olika multikomponentblandningar av organiska kemiska föreningar framgångsrikt genom användandet av CA. Senare har CA även kunnat prediktera toxiciteten för kemiska blandningar innehållande pesticider med liknande toxikologisk profil.

För multikomponenta kemiska blandningar bestående av ämnen med olika typer av verkningsmekanismer har *IA* klassifikationen gett rimliga prediktioner av toxiciteten av

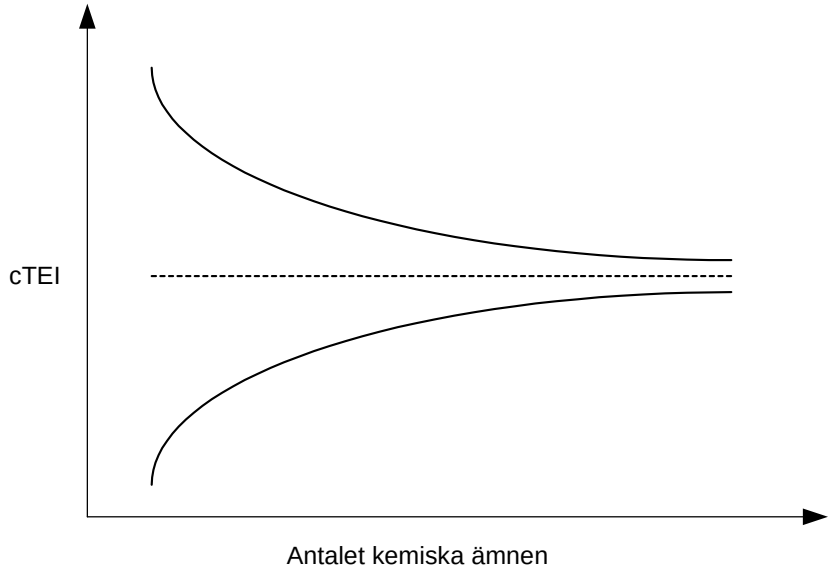
kemiska blandningar i ett flertal studier. Ett exempel är Backhaus et al. (2000), som visar att toxiciteten av en blandning av olikverkande kemikalier beskrivs väl av IA-metoden och att CA-metoden överskattar toxiciteten med en faktor mindre än tre (figur 1, höger). Författarna rekommenderar därför att CA-metoden används för att beräkna toxiciteten för blandningar vars sammansättning inte är känd, eftersom den ger ett konservativt resultat. Ett jämförande exempel är Backhaus et al. (2003), där en blandning om 14 olikartade ämnen användes i ett biotest med *Vibrio fischeri* och 18 likartade (herbicidverkande s-triaziner) ämnen i ett biotest med grönalgen *Scenedesmus vacuolatus* (Figur 1). Studien visade att 1) IA vanligtvis predikterade lägre toxicitet än CA och 2) att prediktionskvalitén för båda metoderna vanligtvis är lägre om modellantagandena inte överensstämmer med verkningsmekanismerna.



Figur 1. Vänster: Observerade (fylld cirkel) och predikterade (linje) effekter av 18 olika s-triaziner på reproduktionen av grönalgen *Scenedesmus vacuolatus*. IA=oberoende verkan, CA=additiv samverkan. Höger: Observerade och predikterade effekter av 14 olika giftiga kemikalier på bioluminiscens av den marina bakterien *Vibrio fischeri*. Figuren är från Backhaus et al. (2003). Underlaget till den vänstra figuren finns i Faust et al. (2001) och underlaget till den högra figuren i Backhaus et al. (2000)

I ett senare arbete kom Altenburger et al. (2004) fram till ungefär samma slutsats. De testade blandningar av tio PAHs och pesticider, som identifierats i sedimentprover, på kulturer av *Sc. vacuolatus* och fann att den kombinerade effekten var lägre än förväntad av koncentrations-addition men högre än förväntad av oberoende respons. En blandning av 11 pesticider, tenn-organiska föreningar och PAHs (Walter et al., 2002) gav liknande resultat. Är man inte säker på att komponenterna i den blandning som ska toxicitetsbedömas har likartad verknings-mekanism, kan det vara lämpligt att använda en kombination av koncentrationsaddition och oberoende respons för att avgränsa ett prediktionsfönster för blandningseffekten.

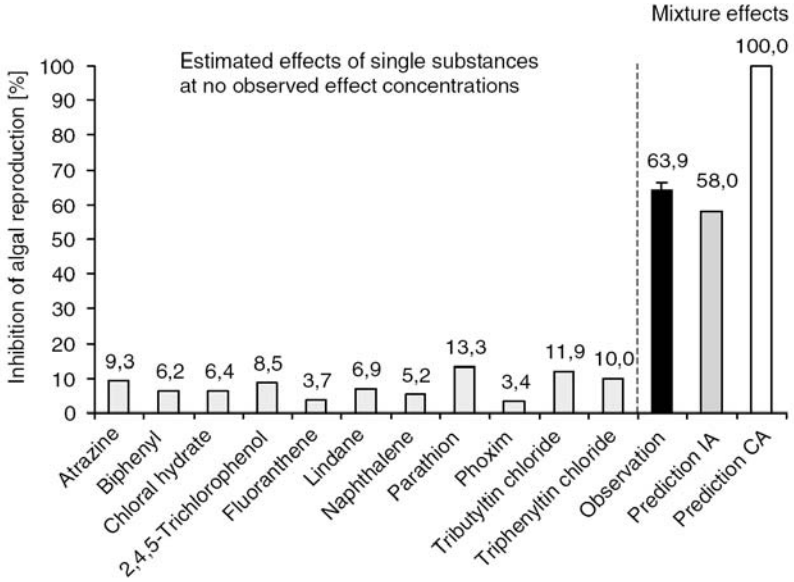
Warne och Hawker (1995) introducerade en ”funnel hypothesis”, i vilken avvikelserna från koncentrationsaddition blir allt mindre ju fler komponenter blandningen innehåller (**Figur 2**). Hypotesen predikterar också att toxiciteten för blandningar med höga kemikaliekoncentrationer avviker mera från dosaddition än toxiciteten för blandningar med låga kemikaliekoncentrationer. Den prediktionen ansluter till tidigare observationer och förklaringar (McCarty och Mackay, 1993) om att blandningar av kemikalier ansluter bättre till koncentrationsadditionsmetoden ju fler komponenter de har och ju lägre koncentrationer de uppträder i. Warne och Hawker (1995) föreslog att icke-additiva interaktioner (synergistiska eller antagonistiska) endast dominerar i kemiska blandningar med få toxiska ämnen. Warne argumenterar att ”The Funnel Hypothesis” kan användas för organiska-organiska, metall-metall och metall-organiska blandningar. Han baserar sin ståndpunkt på en litteraturgenomgång av 973 olika kemiska blandningar, vilka företrädesvis kan beskrivas som koncentrationsadditiva (Warne, 2003).



Figur 2. Illustration av ”The Funnel Hypothesis”. När antalet toxiska ämnen i en blandningen ökar, kommer blandningen närmare ”corrected Toxic Enhancenment Index” (cTEI) vilket är densamma som CA≈ 1. Avvikelse från additions metoden är vanligast med få ingående komponenter i den kemiska blandningen (Warne, 2003).

Det finns litteratur som visar att ekvivalenttoxiska blandningar innehållande från 8 till 50 olika organiska kemikalier med likartad verkningsmekanism är koncentrationsadditiva. I tidiga arbeten begränsades jämförelser av koncentrationsaddition och responsaddition oftast till en effektnivå och blandningar vid låga koncentrationer ingick inte. Det finns emellertid ingen

bestämd nedre gräns för kemikaliekoncentration där denna inte medverkar till blandningens totala toxicitet (Altenburger et al., 1996; Altenburger et al., 2004), vilket innebär betydande konsekvenser för riskbedömning av bl.a. yt- och grundvatten, som innehåller ett stort antal ospecifikt verkande kemikalier i låga koncentrationer. Ett illustrativt exempel är resultatet från de kroniska (en generationstid för en grönalg) test som Walter et al (2002) gjorde av en blandning av 11 olikartade kemikalier vid respektive kemikalies NOEC-koncentration. Blandningen hade betydligt större effekt på algreproduktionen än någon av de individuella komponenterna, och blandningseffekten predikterades betydligt bättre med utgångspunkt från oberoende effekt än från koncentrationsadditiv (figur 3). En liknande iakttagelse gjordes av Silva et al. (2002), som fann att en blandning av åtta hormonstörande ämnen, såsom hydroxylerade PCBs och bensofenoner, gav 50-100 gånger större effekt än förväntat av någon av de individuella kemikalierna vid koncentrationer som var lägre än deras NOEC-värden. Koncentrationsaddition i kombination med riskberäkning med TEF-index gav den bästa prediktionen av den observerade toxiciteten av blandningen, medan antagande om oberoende effekt och effektsummering underskattade toxiciteten med en faktor 20. Flera forskare är mycket tydliga i tolkningen av testresultat med låga koncentrationer: ”If all compounds in a mixture act through the same mechanism, there is no concentration below which a compound will no longer contribute to the overall toxicity of the mixture.” (Deneer et al., 1988) och ”for classes of organic substances with common and well defined QSAR there is apparently no lower concentration at which individual toxicants do not contribute their full toxic potential” (Vighi och Calamari, 1996)



Figur 3. Predikterad och observerad inhibering av reproduktion av *Scendesmus vacuolatus* för blandningar av 11 prioriterade föroreningar som förekommer i halter som understiger NOEC-värdet för varje enskilt ämne (Walter et al., 2002).

Interaktioner

Kemikalier kan interagera med varandra under upptagning och omsättning eller eller under påverkan av en receptor eller ett organ och därigenom påverka blandningens toxicitet. De vanligaste fenomenen är synergism (mer än additiv effekt) och antagonism (mindre än additiv effekt). Ämnen som t.ex.inducerar eller inhiberar nedbrytningsenzymer kan ha stor inverkan på toxiciteten av andra ämnen.

Borgert et al. (2001) föreslog fem kriterier som skulle kunna användas för att avgöra hur användbara och trovärdiga toxikologiska studier av interaktioner är vid en riskbedömning: 1) dos-responskurvorna för kemikalierna i blandningen bör vara väl karakteriserade med t.ex.dosintervall som svarar mot det i en blandning; 2) en lämplig icke-interaktionsnollhypotes måste formuleras, baserad på t.ex.IA eller CA; 3) effekten av kombinationer av kemikalierna bör bestämmas för en tillräckligt hög spännvidd av koncentrationer, eftersom toxiciteten för en blandning beror på bl.a. koncentrationen av komponenterna och deras koncentrationer i förhållande till varandra; 4) en formell statistisk test bör användas för att avgöra huruvida responsen av doskombinationerna i blandningen är annorlunda än den man förväntar sig av nollhypotesen om icke-interaktion; 5) interaktionerna bör bedömas vid en för ändamålet

relevant nivå av biologisk organisation, t.ex.molekylär, cell eller individ. Författaren analyserar studier som uppfyller alla kriterierna och sådana som inte gör det men får kritik av en referee för att inte lägga vikt vid betydelsen av kvantitativ redovisning av styrkan i en interaktion när informationen ska användas i en riskbedömning.

Koncentrationsaddition, responsaddition och interaktion har nyligen integrerats i en och samma modell för prediktion av toxiciteten (R, respons som % inhibition) av en ternär blandning av olika ämnen (Rider och LeBlanc, 2005):

$$R = 1 - \prod_{I=1}^{N} \left\{ 1 - \frac{1}{1 + \frac{1}{\left[\sum_{i=1}^{n} \frac{k_{a,j}(C_a) \times C_i}{EC50_i} \right]^p}} \right\}$$

där $k_{a,j}$ är en funktion som beskriver hur kemikalie *a* i blandningen vid koncentrationen C_a påverkar koncentrationen av kemikalie *i* (interaktionstermen), $R=1-\prod(1-R_i)$ är uttrycket för responsadditionen, i vilket R_i är responsen på de koncentrationsadditiva kemikalierna i ”kassetten” *i*, en grupp av likartade kemikalier, C_i är den adderade koncentrationen av kemikalierna i ”kassetten” *i*, och *p* är den genomsnittliga lutningen för dos-responskurvorna för kemikalierna i blandningen. Modellen är relativt enkel att applicera men kräver rigorösa experiment för att bestämma graden av interaktion mellan olika kemikalier, t.ex.då responsen på en kemikalie modifierar organismens respons på en annan.

Den hittills mest omfattande översikten av toxiciteten av kemikalieblandningar (Ross, 1996; Ross och Warne, 1997) analyserade 973 binära, tertiära och kvarternära blandningar. Det visade sig att mellan 75 och 80 % av blandningarna var koncentrationsadditiva och 20-25 % antagonistiska eller synergistiska. Den uppgiften om andelen antagonistiska och synergistiska blandningar stämmer väl överens med uppgifter i Faust et al. (1994), som anger 34 %, i Deneer (2000) (>10 %) och i Warne och Hawker (1995), som fann 23 % interaktiva blandningar. Samstämmigheten i analyserna stödjer den generella uppfattningen att 10-30% av enkla kemikalieblandningar är antagonistiska eller synergistiska. Både Warne och Hawker (1995) och Ross och Warne (1997) visar att de antagonistiska och synergistiska blandningarna var ungefär lika många. Toxiciteten för dessa blandningar avviker dock inte extremt mycket från den förväntade toxiciteten om de vore koncentrationsadditiva. Blott 5 % av blandningarna hade en toxicitet som avvek med mer än en faktor 2.5 från den förväntade

enligt koncentrationsadditionsmetoden, och 1 % av blandningarna avvek med mer än en faktor 5.

Farmakokinetiska modeller (PBPK)

Fysiologiskt baserade farmakokinetiska (PBPK) modeller representerar en organism med en uppsättning kommunicerande organ och beskriver upptagning, fördelning, omsättning och exkretion i organismen med algebra och differentialekvationer. För binära blandningar använder man två identiska Michaelis-Menten ekvationer, en för varje kemikalie, tillsammans med en ekvation som beskriver interaktionen mellan dem. Systemet kan extrapoleras till mera komplicerade kemikalieblandningar genom att kombinera ekvationer för de ingående kemikalierna i alla tänkbara kombinationer av binära blandningar (Krishnan et al., 2002). Metodiken begränsas av behovet av att kunna karakterisera och kvantifiera alla binära interaktioner i modellerna. Ett sätt att kringå en del av problemen är att utnyttja nätverksreaktionsmodeller. Grundidén är att använda ett nätverk för att representera struktur och reaktionsmönster för komponenterna i blandningen och karakterisera relationerna mellan dem, t.ex.interaktioner. Modellen genererar kinetiska uttryck för de kemiska reaktioner som ger upphov till blandningens egenskaper, t.ex.isomerisation och kokpunkt. Nätverksmönstret har förenklats genom att organisera komponenterna i grupper med likartade kemiska egenskaper (”lumping”). I förlängningen är det tänkt att använda nätverksreaktionsmodeller för att beskriva metabolism och toxiska mekanismer för kemikalier i blandningar, utgående från en bestämning av reaktionsregler och reaktionsgrupper i blandningen (Liao et al., 2002),

Kvantitativa struktur-aktivitetsrelationer (QSAR)

Eftersom det tas för givet att biologiska effekter av en kemikalie beror på dess struktur, har det utvecklats empiriska modeller för att prediktera farmakologiska effekter av läkemedel och toxiska effekter av pesticider och andra kemikalier baserade på strukturella egenskaper. Sådana modeller, s k struktur-aktivitetsrelationer, är ofta kvantitativa (QSAR) och används för att beräkna effekter när testdata saknas. Modellerna kan också användas för att klassificera kemikalier, antingen utifrån deras egenskaper, såsom cancerogenitet och teratogenitet, eller utifrån sin verkningsmekanism. Gramatica et al. (2001) har t.ex.visat att fenylurea och triaziner kan ordnas i grupper med likartad toxikologisk verkningsmekanism, med utgångspunkt från drygt 170 olika molekylära deskriptorer, låt vara att den toxikologiska betydelsen av deskriptorerna är oklar.

En av de större utmaningarna för QSAR-modellering är identifiering och avgränsning av de kemikalier som ingår i den grupp som ska analyseras. Den vanligaste metoden är att utgå från homologa ämnen, t.ex.alifatiska kolväten, eller sådana som delar en funktionell grupp, t.ex.aminer, hydroxigrupper och karboxylgrupper. Alternativt kan man identifiera grupptillhörigheten utifrån verkningsmekanismen, men det kräver att kemikalierna har testats med den utgångspunkten. Den vanligaste beräkningsmetoden är regression av en effekt-parameter,såsom EC_{50}, mot en egenskap för kemikalien, såsom oktanol/vatten-fördelnings-koefficienten, K_{ow}. I ECOSAR på EPAs hemsida finns över 100 QSARs för ett 50-tal kemiska grupper.

Om man vet vilka komponenter som ingår i den kemiska blandningen och att de har additiva toxiska egenskaper kan effekten av blandningen beräknas ((Altenburger et al., 2003):

$$\log A = a \log \sum (x_i D_{1i}) + b \log \sum (x_i D_{2i}) + ...z$$

där *A* uttrycker den effekt som ska beräknas, D_1 och D_2 är strukturella deskriptorer och *a*, *b* och *z* är regressionskoefficienter. För hydrofoba ämnen kan man sålunda beräkna den viktade fördelningskoefficienten för blandningen som

$$\log K_{ow(mix)} = \log\left\{\sum \left[x_i (K_{ow})_i\right]\right\}$$

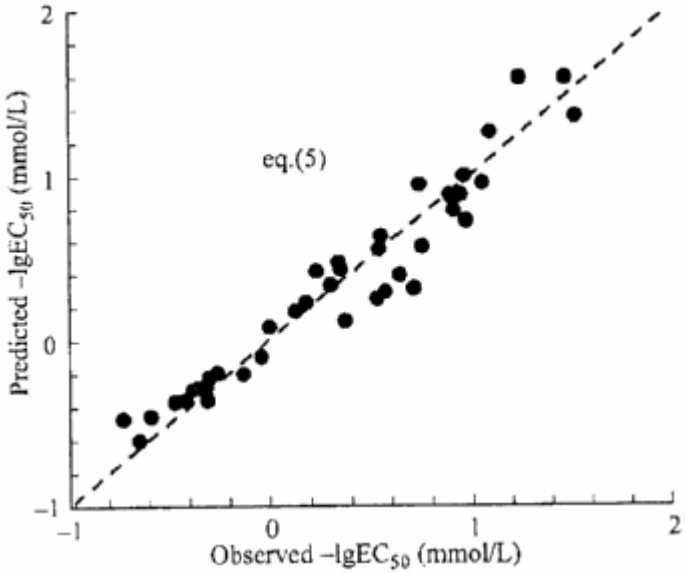
och effekten av blandningen som

$$\log \frac{1}{EC_{50(mix)}} = a \log\left\{\sum \left[x_i (K_{ow})_i\right]\right\} + b$$

QSAR-modeller har använts för att prediktera toxiciteten av både polära och opolära substituerade aromatiska ämnen, såsom bensen, toluen, xylen, kloro- och nitrofenoler och anilin med stor noggrannhet (r^2>0.9) (Wei et al., 2004) se Figur 4. Hermens et al. (1985b) observerade att toxiciteten av blandningar av icke-reaktiva organiska ämnen, såsom alkoholer, etrar och klorerade alifatiska och aromatiska kolväten, kan predikteras med hjälp av hydrofobiciteten, att toxiciteten av klor- och alkylaniliner dessutom kräver en uppgift om det elektroniska bidraget från ringsubstituenterna (Hammer-konstanten), och att toxiciteten av reaktiva halogenerade kolväten, såsom benzylklorid och kloraceton kan predikteras med uppgift om reaktiviteten mot en nukleofil modellsubstans. Nirmalakhandan et al. (1994) visade att toxiciteten för mikroorganismer av blandningar av ett 50-tal kemikalier som listats

som ”chemicals of concern to the US Air Force” kunde förutsägas genom beräkning av EC_{50} för de enskilda komponenterna baserat på ett index för komponentens molekylära topologi kombinerat med koncentrationsaddition. Visserligen kunde blandningens toxicitet förutsägas med större precision med observerade data från toxiciteten av de individuella komponenterna (r^2=0.99) än med QSAR-beräkningar (r^2=0.79), men precisionen i QSAR-beräkningen var inte sämre än den som redovisas i litteraturen för förutsägelser av enskilda kemikaliers toxicitet.

Andra som studerat att använda QSAR för att bedöma toxiciteten av kemiska blandningar är (Warne et al., 1989) och (Xu och Nirmalakhandan, 1998).



Figur 4. Jämförelse av observerat –log EC_{50} vs predikterade värden för 22 ensamma polära ämnen och för 18 kemiska blandningar utan bensen. Streckad linje representerar 1:1 (Wei et al., 2004).

Att använda index av något slag för att beskriva och sammanfatta effekten av blandningar av kemikalier är populärt och accepterat både i forskar- och myndighetsvärlden. Ett index är ett utmärkt och rationellt sätt att kondensera och sammanfatta stora mängder av data om blandningar, men det kan samtidigt användas för att sammanfatta få data från experiment med tveksam design. Men det finns två huvudinvändningar mot användningen av index i riskbedömningen (Altenburg et al., 2003): 1) index ger bara en punktskattning, till skillnad från t.ex.en dos-responskurva; 2) index tar inte hänsyn till variationer i responsen, alltså riskanalysens osäkerhetsaspekt. Riskbedömaren får alltså ingen information från ett index för att avgöra hur sannolikt data ansluter till en koncentrationsadditionsmetod eller hur sannolikt toxiciteten av blandningen överstiger ett visst toxiskt referensvärde.

Tabell 4. Sammanfattning av de begrepp som förekommer i litteraturen.

Koncept	Synonym(er)	Svenska begrepp	Observerad effekt
Non-interaction	Dose addition Simple similar action Additivity Concentration addition Simple joint action Summation Loewe additivity	Dosaddition Likartad verkan Koncentration saddition	Kemikalier kan ha samma effekt och vara olika i farlighet. Det betyder att kombinationseffekten kan beräknas från dosen eller koncentrationen av de individuella kemikalierna
	Simple dissimilar action Simple independent action Independent joint action Effect/response addition Bliss independence	Oberoende verkan Effektaddition	De individuella kemikalierna har olika effekt så att den förväntade effekten är additiv
Interaction	Synergism Augmentation Potentiation Supra-additivity	Synergi Förstärkning	Den kombinerade effekten är större än förväntat av en additiv effekt de enskilda kemikalierna
	Antagonism Depontentiation Sub-additivity Inhibition Infra-additivity Negative synergy Masking	Antagonism	Den kombinerade effekten är mindre än förväntat av en additiv effekt av de enskilda kemikalierna.

Modeller för riskanalys av kemikalieblandningar

Det finns ett antal olika metoder för att analysera miljö- och hälsorisker av blandningar av kemikalier. De bygger på olika, för tolkningen begränsande, antaganden och kräver tillgång till toxikologiska data som gäller samma måltavla (end point) och samma typ av exponering (t.ex.akut eller kronisk) för alla komponenter som analyseras. Om man antar att komponenterna i en blandning är likartade, ska man välja data för en måltavla som är associerad till den förmodade gemensamma verkningsmekanismen, vilket inte nödvändigtvis behöver vara samma måltavla som ger den största effekten av en viss komponent. Det är alltså inte självklart att en riskanalys av en kemikalieblandning baseras på de känsligaste toxikologiska måltavlorna för de enskilda komponenterna (Wilkinson et al., 1999).

Varje metod har också en stor portion osäkerhet, som beror på bl.a. naturliga variationer i exponering och effekt mellan individer och miljöer och osäkerheter i metoder och modeller. En av de stora utmaningarna för riskanalysen av kemikalieblandningar är att transformera

osäkerheten från analysen av en art till en annan, från en kemikalie till en annan och från t.ex.djurförsök till människa. Om transformationen görs via matematiska modeller kan t.ex.Monte Carlo-analys användas. Om osäkerheten om toxiciteten av en blandning ska transformeras från försöksdjur till människa kan man göra en konservativ skattning, vilket är vanligt för enskilda komponenter. Då samlar man osäkerhten om variationen mellan olika arter i en osäkerhetsfaktor om 10 och tar hänsyn till variationen mellan olika individer av människa med ytterligare en faktor 10, så att ett gränsvärde eller acceptabel referensdos blir en faktor 100 lägre än dosen för den lägsta effekt man observerat hos försöksdjur. Om osäkerheten om toxiciteten är ungefär densamma för alla komponenterna i en blandning, kommer alla riskanalysmetoder som bygger på additiva samband att föreslå samma gränsvärde. I praktiken är det ovanligt, och det sätt på vilket osäkerheten hanteras i olika metoder kommer att påverka beräkningen av gränsvärdet för blandningen.

Faroindex

En av de vanligaste och viktigaste metoderna att bestämma risken med exponering för kemiska blandningar är faroindex (eng. Hazard index, HI). Faroindex (FI) förutsätter att komponenterna i blandningen liknar varandra så att de är utbytbara, och blandningsdosen är lika med summan av doserna av komponenterna. Faroindex har bland annat antagits och rekommenderas av ett flertal nordamerikanska myndigheter (ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists), NAS (National Academy of Science), NRC (National Research Council), OSHA (Occupational Safety & Health Administration) och EPA (United States Environmental Protection Agency)). Exponeringen eller dosen för de olika ämnena i den specifika kemiska blandningen är satt i förhållande till den nivå på exponering som anses som acceptabel eller säker av den organisation som utför bedömningen. Den definierade säkra nivån kan vara exempelvis EU:s DNEL-värde (Defined No Effect Level) eller USA:s (ATSDR) MRL-värde (Minimal Risk Level).

Faroindex för en blandning utan interaktioner mellan komponenterna kan beräknas enligt:

$$FI = \frac{E_1}{SN_1} + \frac{E_2}{SN_2} + ... + \frac{E_n}{SN_n} \quad eller \quad FI = \sum_{i=1}^{n} \frac{E_i}{SN_i}$$

där E_i är exponeringsnivån för komponent *i* och SN_i är den ”säkra nivå” eller officiella gränsvärdet för komponenten *i*.

För den händelse att man misstänker parvisa interaktioner mellan blandningens komponenter, föreslår EPA (2000) att man inkluderar en osäkerhetsfaktor i beräkningen:

$$FI_{INT} = FI \times UF_I^{WOE_N}$$

där UF_I är en osäkerhetsfaktor som sätts till 10, WOE representerar weight-of evidence (se nedan) och exponenten WOE_N är ett normaliserat värde, definierat av

$$WOE_N = \frac{WOE_S}{WOE_{MAX}}$$

där

$$WOE_S = \sum_{j=1}^{n} \sum_{k \neq j}^{n} \frac{FQ_j}{FI} B_{jk} \sqrt{FQ_j \times FQ_k}$$

$$WOE_{MAX} = \sum_{j=1}^{n} \sum_{k \neq j}^{n} \frac{FQ_j}{FI} \sqrt{FQ_j \times FQ_k}$$

där n=antalet kemikalier i blandningen, *j*, *k* är index för de kemikaliepar vars interaktion beaktas, FQ_j är farokvoten för komponenten *j* och $B_{j,k}$ är WOE värdet för påverkan av komponent *j* på toxiciteten av komponent *k*. FQ är kvoten mellan en exponeringskoncentration (C_e) och en toxikologisk benchmark-koncentration (C_b), som kan representeras på många sätt. I Europa är det vanligt att representera C_b med den predikterade koncentrationen av en kemikalie i miljön (PEC) och C_b med den predikterade koncentration som inte ger någon toxisk effekt (PNEC).

WOE-proceduren, som beskrivs i EPA (2000), är en expertbaserad bedömning av omfattning och kvalitet på informationen från interaktionsstudier och av mängderna av komponenterna i en blandning. I bedömningen tar man hänsyn till bl.a. hur väl binära interaktioner i en blandning är karakteriserade, hur relevanta interaktionerna är för toxiciteten och hur pålitlig en extrapolering av informationen till den aktuella exponeringen kan göras. Modellen för att bestämma FI_{INT} är tilltalande enkel, eftersom den använder en enda multiplikationsfaktor för att uttrycka det samlade bidraget av alla parvisa interaktioner i blandningen. Enkelheten är samtidigt den största svagheten, och modellen har kompletterats med en faktor som reglerar varje individuell FQ_j och med en parameter som anger graden av interaktion mellan komponent *j* och *k* (Hertzberg och Teuschler, 2002).

Alternativt kan FI för blandningar med interaktioner beräknas med utgångspunkt från data från PBPK-modellering. Det förutsätter att man kan beräkna förändringar i vävnadskoncentrationen (TM_i) av enskilda komponenter (*i*) i blandningen som en följd av farmakokinetiska interaktioner mellan dem (Haddad et al., 2000). Om man känner den vävnadskoncentrationen (TR_i) av de enskilda komponenterna som PBPK-modellering uppskattat som ett officiellt gränsvärde, kan man beräkna FI för interaktiva ämnen i en blandning med *n* komponenter som (Haddad et al., 2001).

$$FI_{\text{int}\,eraktion} = \sum_{i=1}^{n} \frac{TM_i}{TR_i}$$

FI anses generellt ha förtjänster genom att vara transparent och anknyta till gränsvärdes-begrepp som är kända och accepterade på myndighetsnivå. Detta gränsvärde eller ”säkra värde” representerar samtidigt nackdelen med FI, eftersom det redan innehåller en påbjuden osäkerhetsfaktor för varje komponent. När osäkerhetsfaktorerna summeras blåses därför osäkerheten för blandningen upp till orealistiska nivåer, vilket blir särskilt problematiskt om osäkerhetsfaktorn bygger på policyförankrade antaganden.

Point of departure index (PODI)

Istället för att summera doserna av de individuella komponenterna baserat på deras ”säkra nivå”, kan man summera med hänsyn till ”point of departure” (POD) för komponenterna. I miljöriskanalys har POD representerat den lägsta experientella dosen i ett toxikologiskt test, i praktiken lika med värdet för NOAEL eller LOAEL. Denna praxis har kritiserats, bl.a. för att NOAEL/LOAEL-strukturen är känslig för stickprovsstorleken och varierar från ett experiment till ett annat (Leisenring. W och Ryan, 1992). I stället har POD kommit att beräknas från BMD (benchmark dose) genom att anpassa en matematisk eller statistisk modell till dos-respons-data och extrapolera så att POD kan beräknas som den BMD som motsvarar 5 % eller 10 % respons. Ett PODI för blandningen kan beräknas från de individuella komponenternas exponering:

$$PODI = \frac{E_1}{POD_1} + \frac{E_2}{POD_2} + \ldots\ldots\ldots + \frac{E_n}{POD_n} \quad eller \quad PODI = \sum_{i=1}^{n} \frac{E_i}{POD_i}$$

PODI-värdet kan multipliceras med en osäkerhetsfaktor som gäller för blandningen.

Exponeringsmarginal (MOE)

MOE är kvoten mellan POD och exponeringsnivån:

$$MOE = \frac{POD}{E}$$

och ofta använt som riskmodell i yrkesmedicinska sammanhang för bedömning av enskilda kemikalier. MOE>100 anses acceptabelt när toxikologiska data kommer från djurtester. För en blandning beräknas den kombinerade MOE (MOE_T) som

$$MOE_T = \frac{1}{\frac{1}{MOE_1} + \frac{1}{MOE_2} + \frac{1}{MOE}} osv$$

MOE_T är inversen till PODI och delar dess fördel att direkt baseras på exponerings- och toxicitetsdata och att en för blandningen gemensam osäkerhetsfaktor beräknas/uppskattas. Nackdelen är att värdet för MOE_T successivt minskar när fler komponenter ingår, så att en blandning som innehåller två eller tre komponenter, vars individuella MOEs är 100, kommer att få MOE_T på 75 och 33, respektive. Det förefaller därför enklare att använda PODI-modellen.

Toxisk ekvivalensfaktor (TEF)

TEF-modellen uttrycker blandningens toxicitet, i form av toxiska ekvivalenter (TEQ), som summan av komponenternas, normerade i förhållande till en s.k. indexkomponent (IC), för vilken den toxikologiska informationen är tillfredsställande. TEF-faktorn för en komponent *i* beräknas som POD för indexkomponenten dividerad med POD for komponenten *i*, och komponentens bidrag till blandningens toxicitet fås genom att multiplicera dess TEF med dess koncentration C_i:

$$TEQ = \sum_{i=1}^{n} C_i \times TEF_i$$

Liksom FI-modellen förutsätter TEF-modellen att kemikalierna i blandningen är likartade, så att de kan ersätta varandra och så att deras doser kan adderas. Om osäkerheten om toxiciteten är lika stor för alla komponenterna spelar det ingen roll vilken av dom som utses

till indexkomponent, men normalt väljer man den komponent för vilken datakvaliteten är bäst. Den egenskapen brukar också vara förenad med mindre osäkerhet, vilket leder till att blandningen också får den lägsta möjliga osäkerheten, så att komponenter i blandningen med begränsad toxikologisk information får högre acceptans än de skulle fått när deras toxicitet bedöms individuellt.

TEF-modellen har använts för strukturellt likartade kemiska grupper, såsom PAHs, PCBs, dioxiner och hormonstörande ämnen (endocrine disruptors). Fördelar och nackdelar med att använda TEF-modellen för att beräkna toxiciteten av blandningar av någon av dessa grupper analyseras av Safe (1998), som inte oväntat finner att hormonstörande ämnen kan påverka varandras toxicitet och att TEF-faktorn har stor variationsbredd för PCB kongener. Han rekommenderar därför att TEF-modellen används med stor försiktighet.

Top-down perspektiv

Under ideala förhållanden borde en riskbedömning av kemikalieblandningar baseras på en identifikation av alla komponenterna i en blandning och en bestämning av toxiciteten för var och en av dem i olika kombinationer och vid relevanta doser. Det är naturligtvis enklare att jämföra effekten av en blandning med effekterna av var och en av komponenterna, vid en dosnivå och en exponeringstid, utan att testa alla möjliga kombinationer av två eller flera kemikalier. En sådan ansats har rekommenderats för riskbedömning av blandningar som inte är särskilt väldokumenterade (Mumtaz et al., 1993) samt tillämpats för definierade blandningar av bl.a. pesticider, cancerogena ämnen och handelsgödning (Chaturvedi, 1993; Heindel et al., 1994; Ito et al., 1995; Yang och Rauckman, 1987). Men det är omöjligt att beskriva synergistiska, antagonistiska, etc, effekter i blandningen om det inte finns åtminstone dos-effekt-kurvor för var och en av komponenterna, och det är t.o.m. svårt att avgöra om effekterna avviker från de som förväntas av CA och IA metoderna eftersom alla kriterier för det urvalet inte är uppfyllda. Även om toxicitetsdata finns tillgängliga för de enskilda komponenterna i en blandning, återstår problemet att extrapolera effekterna från de relativt höga exponeringsnivåer som gäller i laboratorietester till de betydligt lägre koncentrationer som organismer normalt exponeras för i miljön.

För relativt enkla och väldefinierade blandningar om 10 komponenter eller färre skulle bottom-up perspektivet kunna tillämpas och riskerna bedömas med de verktyg som är tillämpliga för CA och IA, men för så komplicerade blandningar som finns på t.ex.förorenad mark, med hundratals organiska och oorganiska komponenter i olika omvandlingsformer, blir

en detaljerad toxikologisk kartläggning praktiskt omöjlig. Många gånger är det omöjligt att genomföra tester med en komplex, intakt blandning vid tillräckligt höga koncentrationer därför att den innehåller en starkt toxisk komponent, t.ex.kolmonoxid i cigarettrök, som utesluter långtidstester. I andra fall har tester av hela komplexa blandningar gett relevant toxikologisk information, t.ex.om cancerogeniteten i dieselavgaser. Ibland är det möjligt och lämpligt att fraktionera en blandning för att identifiera komponenter eller grupper av komponenter med toxiska eller mutagena egenskaper eller för att ersätta en komponent för att få en mindre toxisk blandning. Fraktionering kan dock leda till artefakter, så att fraktionernas toxicitet blir annorlunda än deras bidrag till den komplexa blandningen.

Strategier för att utvärdera komplexa blandningar

Bedömning av riskerna förknippade med kemiska blandningar kan huvudsakligen delas in i tre olika metoder: användning av data på den faktiska kemiska blandningen som är under bedömning, användning av data från kemiska blandningar som i stort liknar den blandning som bedömningen skall utgå ifrån, och användning av data för komponenterna i den kemiska blandningen. Den indelningen avspeglas i de huvudinriktningar som analyserna tagit och som vi ger ett axplock av i detta avsnitt.

Bedömning av hela blandningar

Gemensamt för många av studierna av hela blandningar är en dålig korrelation mellan de kemiska analyserna av blandningar och toxiciteten i biologiska system, exempelvis mellan den bakteriella mutageniciteten (Cizmas et al., 2004; Donnelly, 1987) frekvensen av lungcancertumörer (Goldstein et al., 1998) och koncentrationen av benzo(a)pyren och cancerogena PAHs i kreosot-avfall eller cytokrom P450 induktionen i fiskceller och förorenat urlakningsvatten från soptippar (Fent och Bätscher, 2000), kanske beroende på effeker av oidentifierade komponenter eller oväntade interaktioner mellan komponenterna. Direkta toxicitetstester av komplexa blandningar kan göras som standardiserade tester enligt ett myndighets- eller organisationsprotokoll, som lokalspecifika tester, då man använder organismer från de lokaler där kemikalieblandningar används men i övrigt ofta följer ett standardiseringsprotokoll, och som in-situ tester, då ett lokalspecifikt test görs i fält snarare än i laboratorium.

Bioassay-riktad fraktionering och fraktionering av blandningen och rekombination

Fraktionering av ett prov i t.ex.sura, basiska och neutrala komponenter före toxikologisk test underlättar analysen av kombinationseffekter och är nödvändigt för att få predikterbara samband mellan kemisk sammansättning och genotoxicitet (Cizmas et al., 2004; Donnelly, 1987; Goldstein et al., 1998; Østby et al., 1997). Genom fraktionering av ett kemiskt extrakt av ett sediment från ett vattendrag som tog emot avrinningsvatten från en motorväg, kunde Boxall och Maltby (1997) visa att tre av PAH-erna i sedimentet, pyrén, fluoranthén och fenanthrén, svarade för huvuddelen av sedimentets toxicitet.

Bioassay-riktade fraktioneringar kombinerar enkla, snabba och standardiserade bioassay, t.ex.Ames' test för mutagenicitet, med kemisk fraktionering och analys (Schuetzle och Lewtas, 1986). Testprotokollet bestäms primärt av utfallet av en bioassay. Om mutageniciteten av blandningen efter en första preparativ fraktionering är låg jämfört med ursprungblandningens, modifieras testbetingelserna tills man i fraktionerna återfått blandningens ursprungliga mutagenicitet. Mutageniciteten efter bioassay av varje ny delfraktion avgör om karakteriseringen avbryts (om mutageniciteten av fraktionen är låg) eller om den fortsätter med tester efter ytterligare kemisk separation och analys och efter test av syntetiska representanter för de identifierade komponenterna.

Spikning av komplexa blandningar med individuella komponenter

Bidraget till en blandnings toxicitet av sådana komponenter som identifierats kan bestämmas genom tester, i vilka blandningens effekter jämförs med effekterna av blandningen ”spikad” med de enskilda komponenterna separat vid en eller flera koncentrationer. Med multivariat statistisk analys kan graden av additivitet och interaktion mellan de identifierade och tillsatta komponenterna bestämmas (Bostrøm et al., 1998).

”Lumping”

I denna typ av analys buntas komponenterna i den komplexa blandningen samman som pseudokomponenter. De kan representera en specifik kemikalie eller ett fiktivt medeltal av hela pseudokomponten. Kemikalierna buntas ihop på grundval av egenskaper och uppträdande, t.ex.likheten i en fördelningskoefficient eller i vilka organ som påverkas. Därigenom kan man använda samma riskmodeller för den komplexa blandningen som för

enklare och kända blandningar, låt vara att det finns en osökerhet om hur väl pseudokomponenterna faktiskt representerar blandningen. Tekniken har använts i kombination med QSAR- och PBPK-modeller för att bedöma toxiciteten av komplexa jetbränsleblandningar (Verhaar et al., 1997).

Topp-10-ansats

Topp-10-ansatsen ingår i en tvåstegsprocedur för att bedöma toxiciteten för komplexa blandningar. I det första steget väljer man de 10 komponenter i blandningen som har den största riskpotentialen, d.v.s. de som representerar den högsta kvoten mellan exponeringsnivå och toxicitet, den s k riskkvoten. I det andra steget betraktar man de 10 komponenterna som en enkel blandning, genomför en riskanalys för dem och antar att de är representativa för risken med hela den komplexa blandningen (Feron et al., 1998).

Kemiskt fingeravtryck kombinerat med multivariat effektanalys

I fingeravtrycksstrategin använder man gaskromatografi-masspektrometri för att få ett fingeravtryck av komponenterna i organiska extrakt, t.ex.av sotpartiklar. Varje prov karakteriseras med hjälp av separerade kromatografiska toppar och associerade masspektra samt med ett mutagenicitetstest. Med tillräckligt många och olika prov (förf analyserade 33 prover) kan en multivariat regression bestämma det bästa sambandet mellan mutagenicitetten och mönstret för fingeravtryck. Med t.ex.162 fingeravtrycksegenskaper kunde en regressionsmodell förklara 59% av variationen i mutagenicitet med 92% goodness of fit. Modellen kan användas för att förutsäga mutageniciteten för andra extrakt av sotpartiklar baserat på deras fingeravtryck. Den multivariata analysen kan också identifiera de kromatografiska toppar som samvarierar med mutageniciteten och ge dem större vikt i regressionsanalysen. Samma toppar skulle också kunna identifieras kemiskt och testas separat för mutagenicitet och sitt bidrag till extraktets totala mutagenicitet.

Generellt kan multivariat dataanalys användas för att klarlägga och klassificera mönster för kemiska blandningars sammansättning och toxiska effekter. Till kända multivariata metoder hör klusteranalys, principalkomponentanalys (PCA) och “projection to latent structures” (PLS), som är en regressionsmetod som kan beskriva toxisk verkan som funktion av en blandningens kemiska sammansättning (Eide et al., 2004).

Varianter på temat tillräckligt likt det komplexa

För att skärpa riskbedömningen av komplexa blandningar har bl.a. EPA (2000) föreslagit tre tillvägagångssätt, nämligen surrogatmetoden, jämförande potensmetoden och den relativa potensfaktormetoden. Surrogatmetoden utgår från att blandningen kan karakteriseras av en indikatorkomponent. Denna ingår med känd koncentration i en väldefinierad blandning, som är ”tillräckligt lik” den komplexa blandningen så att den kan anses representera en utspädning baserat på den relativa koncentrationen av indikatorkomponenten. Risken med den komplexa blandningen antas variera proportionellt med risken för surrogatblandningen. I den jämförande potensmetoden använder man toxicitetsdata för några blandningar som är väl karakteriserade som referenser för den ”tillräckligt lika” komplexa blandningen, vars toxicitet rangordnas genom att jämföra potensen med referensernas. Potensfaktorsmetoden använder toxiska ekvivalensfaktorer (TEFs, se avsnitt ovan) för att rangordna blandningskomponenterna och åstadkomma en relativ risk för den komplexa blandningen.

Prioriterade blandningar

För att arbetet och utveckling kring frågan om kemiska blandningar skall gå framåt är det viktigt att kartlägga de blandningar som kan anses vara prioriterade. Sexton och Hattis (2007) föreslår att det urvalet ska göras med utgångspunkt från fyra kriterier:

-omfattningen av exponeringen: kemikalier som ett stort antal organismer, populationer eller samhällen exponeras för kräver särskild uppmärksamhet;

-uttrycken för exponeringen: omfattning, varaktighet och frekvens av exponeringen;

-hur allvarlig effekten är: om exponeringen kan leda till skador som är oacceptabla tillhör blandningen de prioriterade;

-hur troliga interaktioner är: blandningar för vilka effekterna inte kan förutsägas från kännedom om de separata effekterna av de individuella komponenterna hör till de prioriterade.

Författarna använder kriterierna för att försöka ge ett svar på frågan vilka blandningar som är viktigast att analysera och bedöma ur miljö- och hälsosynvinkel. Man utgår från en indelning av blandningar i tre huvudtyper, nämligen sådana med likartade komponenter (liknande struktur, verkningsmekanism eller toxiskt mål), definerade blandningar (sådana med

definierad och förutsägbar sammansättning när de emitteras från tid till annan från en källa) och tillfälliga blandningar (blandningar som uppträder tillfälligt, inte nödvändigtvis med konstant sammansättning) (tabell 5-7).

Tabell 5. Exempel på blandningar med likartade komponenter (Sexton och Hattis, 2007).

Likartad kemisk struktur och/eller egenskaper
Aldehydes Phthalates
Carbamate Pesticides Phytoestrogens
Dioxins Polybrominated Diphenyl Ethers
Furans Polychlorinated Biphenyls
Heavy Metals Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
Organophosphate Pesticides Trihalomethanes
Organochlorine Pesticides Volatile Organic Compounds
Likartade toxikologiska egenskaper och/eller effekter
Allergic Contact Sensitizers Hepatotoxicants
Genetic Carcinogens Immunotoxicants
Nongenetic Carcinogens Nephrotoxicants
Cardiovascular Toxicants Neurotoxicants
Cholinesterase Inhibitors Respiratory Toxicants
Eye Irritants/Toxicants Reproductive Toxicants
Hematotoxicants Skin Irritants/Toxicants
Hormonally Active Agents Teratogens/Developmental Toxicants

Tabell 6. Exempel på definierade blandningar (efter Sexton och Hattis, 2007).

Agricultural Runoff Disinfection By-Products
Gasoline-Powered-Engine Emissions Environmental Tobacco Smoke
Cigarette Smoke Hazardous Waste Site Constituents
Coal-fired Power Plant Emissions Photochemical Smog
Coke Oven Emissions Petroleum Refinery Emissions
Diesel-Powered-Engine Emissions Wood-Burning Emissions

Tabell 7. Exempel på tillfälliga blandningar (efter Sexton och Hattis 2007).

Breast Milk Contaminants Residential Exposures
Dietary Agents Soil Contaminants
Dust Contaminants Stressors in Poor, Inner-City Neighborhoods
Indoor Airborne Contaminants Urban Air Pollution
Occupational Exposures Waterborne Agents

Bland blandningar med likartade komponenter identifierar författarna följande grupper som högprioriterade: persistenta klorerade kolväten, såsom polyklorerade dioxiner, dibenzo-furaner och bifenyler; PAH-er, fosfororganiska pesticider, såsom som klorpyrifos och hormonliknande aktiva ämnen, såsom ftalsyraestrar och PCB-er, samt och neurotoxiner såsom bly, kvicksilver, organiska lösningsmedel och PCB-er.

Av definierade blandningar anses biprodukter av klorering av dricksvatten, såsom trihalometaner och haloacetonitriler, dieselavgaser och emissioner från koleldade kraftverk, såsom partiklar, metaller, kväveoxider och svaveldioxid vara högprioriterade. Bland många möjliga tillfälliga blandningar lyfter författarna fram de komplexa blandningar som arbetare t.ex.i konstruktionsindustri och gruvindustri exponeras för, inomhusluftkemin i bostäder, där framför allt äldre, sjuka och spädbarn tillbringar mycket tid, och innerstadsmiljön.

Metoder som används av internationella organisationer

United Kingdom Environmental Agency (UKEA)

UKEA fokuserar på att ta fram toxiska ekvivalentfaktorer (Toxic equivalence factor, TEF) för ämnesgrupper som är kända som hälso- och miljöfarliga ämnen (Committee on toxicity of chemicals in food, 2007). Sådana TEF har tagits fram för en specifik ämnesgrupp som exempelvis polyklorerade-dibenzo-p-dioxiner (PCDDs), polyklorerade dibenzofuraner (PCDFs) och specifika polyklorerade bifenyler (PCBs). UKEA beräknar den toxiska ekvivalentkvoten, TEQ, som sedan kan jämföras med TDI (Total Daily Intake) för ämnesgruppen för att göra en bedömning av risken för exponering för dessa ämnen.

UKEA har för avsikt att gå vidare med att undersöka om det är möjligt att använda samma tillvägagångssätt för petroleumkolväten inklusive PAHs.

UKEA föreslår att en fraktionsspecifik riktvärdesmodell (Fraction-specific Soil Guideline Values, SGV:s) används vid riskbedömningar av petroleumförorenad mark. Dessa SGV:s representerar en koncentration i marken som kan anses representerar en acceptabel nivå på exponering. Markkoncentrationer av fraktioner av petroleumkolväten jämförs med riktvärden för förorenad mark (SGV) för den specifika fraktionen för att bedöma sannolikheten för skada på hälsa.

Emellertid kan det uppstå en situation där det inte finns någon specifik fraktion med högre koncentration än det specifika riktvärdet men att en potentiell toxikologisk additionseffekt av varje fraktion kan förekomma och därmed också en potentiell hälsorisk. För hantera denna risk används en faroindex/farokvot-ansats. Farokvoten (FQ) för varje fraktion beräknas genom att dividera koncentrationen av fraktionen med SGV. FI beräknas genom att summera FQ för fraktionerna.

Beräkning av faroindex (HI), efter (Committee on toxicity of chemicals in food, 2007). *HQ, F_i* och *SGV* representerar farokvot (Hazard Quotient), andel av ämne *i* och miljökvalitetsnorm för mark (Soil Guideline Value):

$$HI = \sum_{F_i=1}^{16} HQ \;\; F_i = \frac{Uppmätt\ koncentration\ F_i\ (mg\ kg^{-1})}{SGV\ F_i\ (mg\ kg^{-1})}$$

UKEA föreslår också alternativa tillvägagångssätt för att bestämma risker vid exponering för kemiska blandningarmed hänsyn till att TDI är ett grovt index på den relativa toxiciteten av en ämnesgrupp. Ett alternativ är att använda en variant av FI genom att normera exponeringen för en kemikalie i blandningen till TDI för varje enskilt ämne:

$$\frac{Exponering_1}{TDI_1} + \frac{Exponering_2}{TDI_2} + \Lambda + \frac{Exponering_n}{TDI_n} \leq 1$$

Andra myndigheter i Storbritannien använder liknande modeller.

Food Standards Agency summerar TEF:s för alla ämnen för att beräkna den totala toxiska ekvivalenten (TEQ).

Health & Safety Executive använder en metod som benämns ”Reciprocal Calculation Procedure (RCP). RCP är en pragmatisk modell för att bestämma hygieniska gränsvärden för kemiska blandningar av specifika HC-lösningsmedel. Metoden kan uttryckas enligt .

$$\frac{FR_a}{OEL_a} + \frac{FR_b}{OEL_b} + \frac{FR_n}{OEL_n} = \frac{1}{OEL_{sol}}$$

där OEL_{sol} är det hygieniska gränsvärdet för HC-lösningsmedlet, OEL_a är det hygieniska gränsvärdet för ett specifikt kolväte i lösningsmedlet, FR_a är andelen (v/v) av komponent ´a´ i HC-lösningsmedlet (Committee on toxicity of chemicals in food, 2007).

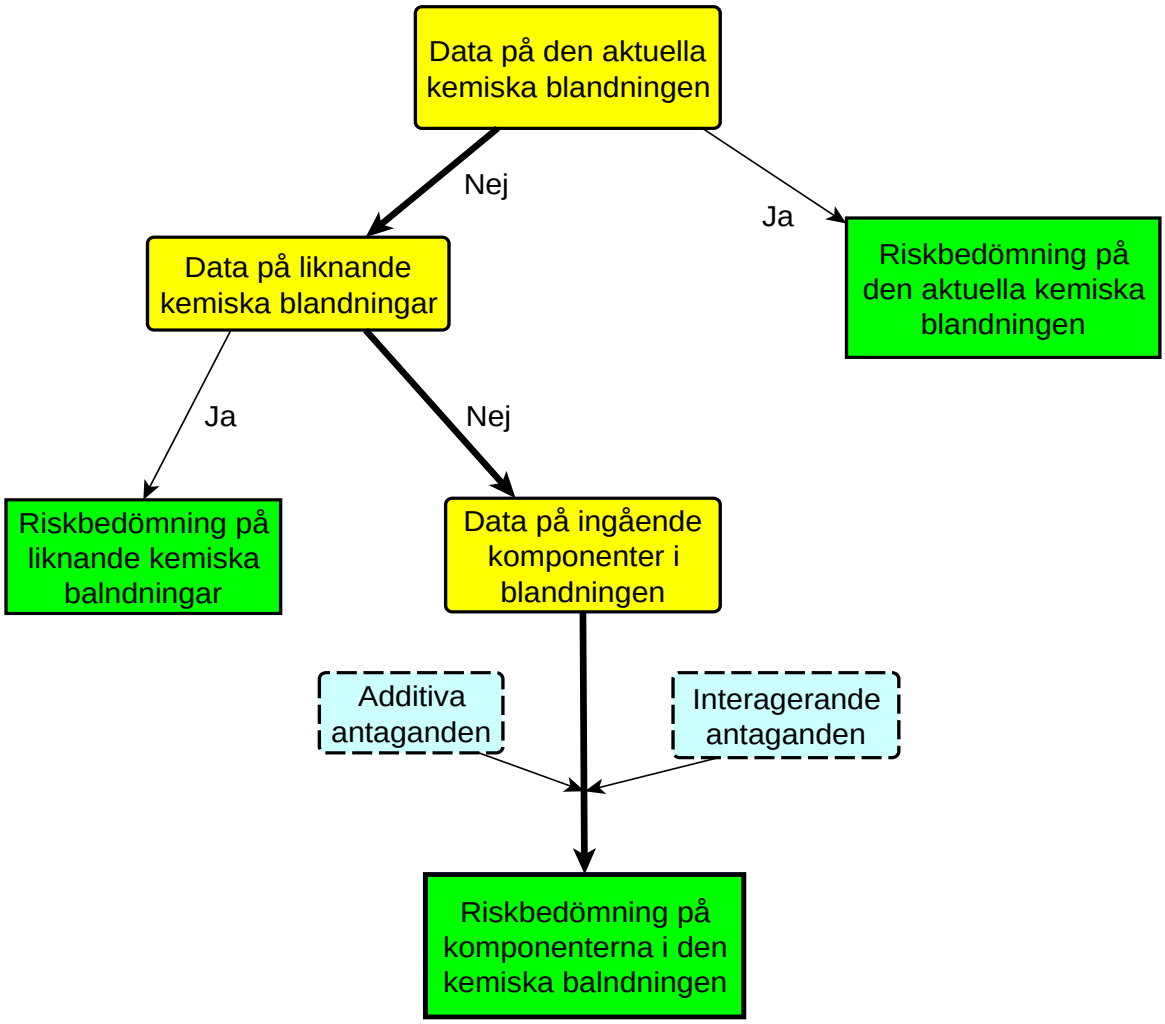
Förutsättningen för att ekvationen skall gälla är att ämnena i lösningsmedlet kan anses ha en additiv toxisk respons samt att de specifika ämnena förekommer i samma halt i lösningsmedlet som i inandningsluften.

Om det finns risk för synergistiska effekter i en kemisk blandning föreslås att man gör en specifik miljöriskanalys för en sådan blandning. Sådana blandningar skall bedömas från fall till fall av experter.

United States Environmental Protection Agency (EPA)

Koncentrationsaddition föreslås av US.EPA som standardmetod för kemiska blandningar under förutsättning att de ingående ämnena har liknande toxikologisk ”end-point” och toxiokinetik. Koncentrationsaddition kan tillämpas i tre olika riskmodeller: relativ potensfaktor (eng. *relative potency factor*) RPF, toxisk ekvivalentsfaktor (eng. *toxic equivalency factor*) TEF och faroindex (eng. *hazard index*) FI. I de fall då påverkansmekanismen är studerad och känd rekommenderas att RPF och TEF, används medan FI rekommenderas i de fall när effektmekanismerna är okända (Monosson, 2005; U.S. Environmental Protection Agency, 2000). Det är också möjligt att kombinera FI-metoden med WOE (weight-of-evidence) i de fall då finns skäl att tro att den kemiska blandningen avviker från koncentrationsadditionsmetoden.

US.EPA rekommenderar användandet av RTF vid riskbedömning av kombinationseffekter av biocidliknande ämnen med samma toxikologiska verkningsmekanismer (U.S. Environmental Protection Agency, 2003). Figur 5 sammanfattar strukturen för EPAs strategi för riskbedömning av kemikalieblandningar, beroende på datakvalité, typ av kemisk blandning och ingående komponenter.



Figur 5. Schematisk skiss över arbetsgången för bedömning av kemiska blandningar (U.S. Environmental Protection Agency, 2000).

Australien och Nya Zeeland

De föreslagna miljökvalitetskriterierna (eng. water quality guidelines) för Australien och Nya Zeeland för utsläpp av kemiska blandningar till ytvattendrag baseras på följande (Australian and New Zealand Environment and Conservation Council och Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, 2000):

Om den kemiska blandningen kan klassificeras som en enkel blandning (d.v.s. vanligtvis upp till 5 specifika ämnen under förutsättning att ämnena bedöms vara koncentrationsadditiva) kan den totala toxiciteten beräknas genom TTM (Total Toxicity of Mixtures) enligt ekvationen

Om TTM överskrider de bestämda riktvärden eller om den kemiska blandningen bedöms vara komplex (d.v.s. > 5 kemiska ämnen och/eller med ett obestämt effektsamband) rekommenderas att man skall gå vidare med att utföra en DTA (Direct Toxicity Assessment)

$$TTM = \sum_{i=1}^{n} \frac{C_a}{WQG_a} + \frac{C_b}{WQG_b} + \ldots\ldots \frac{C_i}{WQG_i}$$

där C_a är koncentrationen av kemikalie *a*, C_b är koncentrationen av kemikalie *b*, o.s.v., WQG är ”Water Quality Guideline” (som motsvaras av en miljökvalitsnorm, ett s.k. EQS-värde) för de specifika kemikalierna. Om TTM är större än 1 anses EQS-värdet överskridet vilket i sådant fall föranleder vidare undersökning och bedömning. Metoden är begränsad till fall när det finns ett EQS-värde för det specifika ämnet.

Svenska och europeiska myndigheters bedömning av kombinationseffekter

Arbetsmiljöverket

Av Arbetsmiljöverket bedöms luftföroreningar med likartad verkan ha koncentrations-additativa egenskaper (Arbetsmiljöverket, 2005). Som exempel på en tillämpning av additiv effekt av luftföroreningar inom yrkesmedicinen nämns organiska lösningsmedels påverkan på centrala nervsystemet och narkotisk, rusgivande eller bedövande effekter. Risken med en exponering för sådana blandningar beräknas med faroindexmetoden.

Till luftburna ämnen med synergistiska effekter räknas lösningsmedlen n-hexan och metyletylketon, MEK. Den blandningen kan ha en nervskadande effekt som är betydligt starkare än beräknat med koncentrationsadditionsmetoden. Trikloretylen bedöms synergistiskt i blandningar med styren (effekt på balanssinnet). Arbetsmiljöverket räknar med synergieffekter vid samtidig exponering för helt olika miljöfaktorer, t.ex. kemiska faktorer och fysikaliska faktorer, som ljus, buller och värme. Tobaksrökning anses verka synergistiskt med många ämnen och med andra arbetsmiljöfaktorer, t.ex. asbestdamm och radon.

Kemikalieinspektionen

Kemikalieinspektionen hanterar kombinationseffekter av kemiska ämnen i KIFS 2005:7 om klassificering och märkning av kemiska produkter (Kemikalieinspektionens författningssamling, 2006). För beredningar med flera miljöfarliga ämnen som tillhör en specifik riskfras bedöms risken med en variant av froindex:

$$\left(\sum_i \frac{P_{Rx_1}}{L_{Rx_1}} + \sum_k \frac{P_{Rx_2}}{L_{Rx_2}} \right) \geq 1$$

där P är koncentrationen av ämnet som tillhör en viss riskfras, *i* = antalet miljöfarliga ämnen med riskfras R_{x1} i beredningen och *k* = antalet miljöfarliga ämnen med riskfras R_{x2} i beredningen. L_{x1} och L_{x2} är en för varje ämne fastställd nedre koncentrationsgräns för att klassificera beredningen som miljöfarlig med en specifik riskfras.

Europakommissionen och Europaparlamentet

Reach, som trädde i kraft 2007 (Europaparlamentet, 2006), kommer tillsammans med GHS-förordningen (The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) att successivt ersätta ett flertal kemikaliedirektiv som inte explicit behandlar risken med utsläpp av kemiska blandningar. I nuläget hänvisar Reach till Europaparlamentets och rådets direktiv 1999/45/EG, vilket sammanfaller med KIFS 2005:7 i frågor som berör märkning och klassificering av flera ämnen i en kemisk produkt. Begreppet kemiska blandningar förekommer i ett fåtal sammanhang i Reach's RIP-dokument (REACH Implementation Projects) i samband med exponering för luftföroreningar och riskhanteringsåtgärder.

Inom EU är "Technical Guidance Document on Risk Assessment (TGD), part II" (European Commission, 2003) ett av de viktigaste vägledningsdokumenten om utsläpp av kemiska ämnen till den yttre miljön men diskuterar inte vilka metoder eller beräkningsmodeller som kan användas vid utsläpp av flera kemiska ämnen vid samma tidpunkt till en gemensam recipient. Huvudspåret i TGD dokumentet är att säkerhetsfaktorn som anges vid bestämning av PNEC-värdet (Predicted No Effect Concentration) även ska inbegripa osäkerheter såsom additiva, synergistiska och antagonistiska effekter när flera kemikalier förekommer samtidigt i exempelvis avloppsvatten.

Resultat från representativa exprimentella studier

Ett flertal studier har visat att CA-metoden är användbar för ett flertal olika ämnesgrupper (Tabell 4).

Tabell 4. Sammanställning av ämnesgrupper som visar att CA-metoden är möjlig att använda för att beräkna toxiciteten för kemiska blandningar.

Ämnesgrupp	Resultat	Referens
Olika grupper av tensider	Additiva egenskaper	Robert och Marshall (1995)
”Commercial formulations of laundry detergents”	Dessa uppvisade addaptiv egenskaper	Warne och Schifko (1999)
Sex metaller	Additiva effecter på *Pimephales promelas* och mer än additiva för *Ceriodahnia dubia*	Spehar och Fiandt (1986)
Kobolt och koppar	Kobolat-koppar blandningar har en antagonistisk effekt upp till 96-h, vid 14-d exponering visades istället en additiv till något synergistisk effekt på *Oncorhynchus mykiss*	Marr et al. (1998)
Aluminium och zink	Additiva effekter på *Salmo salar*	Roy och Campbell (1995)
Ekvivalenttoxisk blandning av fem metaller (Cd, Cu, Ni, Pb och Zn)	Lägre additiva effekter för filtreringshastigheten hos zebramusslor	Kraak et al. (1999)
Litteraturstudie av 202 blandningar av olika pesticider i 26 studier	90 % av alla kemiska blandningar uppvisade koncentrationsadditiva egenskaper inom en faktor 2. Avvikelser från additivitet var vanligast i blandningar med fosfororganiska estrar eller en karbamat med en fosfororganisk ester eller en syntetisk pyretroid. De flesta av testerna var akuttoxiska.	Deneer (2000)
27 binära par av olika pesticider	10 par uppvisade mer än additiv effekt och 17 par uppvisade additiva effekter	Macek (1975)
11 kombinationer av binära kemiska blandningar	Insekticid, fungicid och herbicid uppvisade alla additiva egenskaper på *Oncorhynchus mykiss*	Matthiessen et al. (1988)
Binär kombination av tre olika herbicider och en tensid	De binära kombinationerna hade additiva till mindre additiva effekter på fisk och kräftor (Procambrus spp.)	Abdelghani et al. (1997)
137 binära blandningar av pesticider och tensider	Dosaddition gav bästa prediktionen av blandningstoxicitet i algtester	Altenburger et al. (1996)
Atrazin och flera organofosfat insekticider	Mer än additiv respons för Chronomus tentans	Pape-Lindstrom och Lydy (1997)
Anjoniska och nonjoniska tensider med koppar och kadmium samt biocider	Binära blandningar visade additiva eller mindre än additiva egenskaper för samtliga parblandningar	Pantani et al. (1990)
Blandningar av 550 organiska kemikalier med samma ”mode of action”	Tydliga indikationer på additiva effekter hos *Daphnia magna*	Hermens et al. (1984)
Grupper om 8 till 24 kemikalier med olika ”mode of action”	Blandningarna visade additiva akuttoxiska effekter hos guppies *Poecilia reticulata*	Hermens och Leeuwangh (1982)
Utvärdering av TEFs för	Expertgrupp menar att TEF är lämpligaste riskuttrycket för	Van den Berg et

PCDDs, PCDFs, PCBs	halogenerade aromatiska ämnen av dioxinkaraktär, trots viss osäkerhet och undantag	al. (1998)
Blandningar av 50 olika alkholer, ketoner, aminer, aromater	Dosadditiva effekter på mikroroganismer	Nirmalakhandan et al. (1994)
Kloraniliner, klorfenoler, reaktiva organiska halider och ickereaktiva ickejoniserade organiska ämnen	Blandningarna visade additiva akuttoxiska effekter hos *Poecilia reticulata*	Hermens et al. (1985a)
Grupper om 8 PAHs	Dosadditiva effekter på induktionen av cytokrom P450 i fiskceller.	Fent och Bätscher (2000)
Koppar och diazinon	Mindre än additiv effekt på dödlighet hos *Ephoron virgo*	Van der Geest et al. (2000)
Cyanid och ammoniak	Mer än additiv effekt på *Salmo salar*	Alabaster et al (1983)
Heterocykliska kväve-innehållande föreningar	Additiva och mindre än additiva effekter på *Daphnia magna*	Chen et al (1996)
Binära och multipla blandningar av 7 kemikaliegrupper (7 alkoholer, 4 ketoner, 4 etrar, 3 alkylhalider, 3 benzener, 3 nitriler och 3 tertiära aromater)	Additiva effekter på *Pimephales promelas* för blandningar med upp till 21 kemikalier	Broderius och Kahl (1985)
Binära blandningar av metaller och pesticider	Synergistiska mortalitetseffekter på *Tigriopus brevicornis*	Forget och Bocquené (1999)
Blandningar av 3 tungmetaller, 13 alkoholer, 6 aminer, 6 kolväten, 5 halogenerade kolväten	Blandningar av tungmetaller visade mer än additiva effekter på larver av arten *Xenopus laevis*, samma för aminer. Halogenerade kolväten var additiva, alkoholer och kolväten mindre än additiva. Blandningar av de olika kemikaliegrupperna visade mestadels additiva effekter	De Zwart och Sloof (1987)
Binära och komplexa blandningar av aromater, halogenerade alifater, alkaner, alkoholer, ketoner och estrar	Visade additiva effekter på två olika bakteriekulturer	Xu och Nirmalakhandan (1998)
Binära blandningar av ickepolära och reaktiva aldehyder	Additiva effekter eller mer	Chen och Chiou (1995)
23 ämnen i tvättmedel	Additiva effekter eller mindre för 21 av de 23 ämnena. 67 % av toxiciteten tillskrevs natriumsilikat och tensider	Warne och Schifko (1999)
Diuron med koppar alternativt folpet	Additiva eller mindre än additiva effekter på *Lemna minor*	Teisseire et al (1999)
Fenantren och zink	Antagonistiska effekter på *Cyprinodon variegatus*	Moreu (1999)
Hormonstörande ämnen	Additiva effekter på östrogen-receptor hos jästceller	Silva et al. (2002), Rajapakse et al. (2001)
Hormonstörande ämnen	Sötvattensfisk (*Pimephales promelas*)	(Brian et al., 2005)
Tensider	Test av kemikalierna Dimetoat, Pirimicarb och LAS på *Daphnia magna*	(Engell-Kofoed, 2005)

Erfarenhet av bedömning av vanliga grupper av kemikalier

Metaller

Jak et al. (1996) visade att olika blandningar av metaller uppträdde med en koncentrations-additivt effekt på fyto- och zooplankton.

European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (2001)menar att koncentrationsaddition är förstavalet vid riskbedömning av metallblandningar, så länge man inte har litteraturdata som visar att de bedömda metallerna uppträder på något annat sätt i blandningar.

Biocider

De mest omfattande källorna för information om kronisk toxicitet av binära blandningar av pesticider finns hos Faust et al. (2001). Altenburger et al. (1996) fann att koncentrationsaddition gav den bästa beskrivningen av observationerna från binära blandningar av 137 olika pesticider, men att 10-40 % av blandningarna hade antagonistiska eller synergistiska egenskaper. För mer än 90 % av 202 olika blandningar av insekticider, fungicider och herbicider som använts i 26 studier av akvatiska organismer under åren 1972-98 kunde koncentrationsaddition användas för att prediktera blandningarnas toxicitet, med en felmarginal inom en faktor 2 (Deneer, 2000). Lika många av de avvikande blandningarna bestod av kemikalier med likartat och olikartad verkningssätt, och 75 % av dom avvek från koncentrationsadditions-prediktionen med mindre än en faktor 4. Avvikelserna från koncentrationsaddition fanns i synnerhet i blandningar med fosfororganiska estrar eller med en karbamat tillsammans med fosfororganiska estrar eller en syntetisk pyretroid. I sådana blandningar blir bidraget till blandningens toxicitet från de enskilda komponenterna större än man förväntar sig av koncentrationsaddition.

Ministeriet for Fødevarer, Lundbrug og Fiskeri i Danmark (Klein Reffstrup, 2002) menar att det inte finns tillräckliga vetenskapliga belägg för att använda någon generell riskbedömningsmetod för komplexa biocidblandningar i matvaror. Man föreslår att det bästa alternativet är att genomföra specifika riskbedömningar i varje fall där det föreligger risk för flera biocider i föda. Ämnen för vilka det finns kemisk och toxikologisk data skall bedömas enligt ”weight-of-evidence” (WOE) metodiken. Ministeriet föreslår vidare att satsningar inom

forskningsområdet komplexa biocidblandningar är viktiga för en bättre kvantitativ riskbedömning av hälsofarliga ämnen i mat. Det finns ett stort behov att utveckla metoder och redskap för att möjliggöra adekvata riskanalyser inom detta område.

I akuttoxiska tester tycks binära blandningar av herbicider, fungicider och insekticider visa koncentrationsadditiva egenskaper, och fallen med synergistiska effekter är få.

Tensider

Blandningar av tensider eller av tensider och metaller eller pesticider, visar sällan annat än koncentrationsadditiva effekter i akuttoxiska tester. Ett undantag är toxiciteten av tensider i blandningar i olja, där komponenternas koncentration överstiger deras vattenlöslighet.

Engell-Kofoed, 2005 #24} använde ett standardiserat OECD immobiliseringstest på *Daphnia magna* för att visa att binära och ternära blandningar av två insekticider (dimethoat och pirimikarb) och en detergent (linjär alkylbensensulfonat, LAS) har effekter som kan förutsägas med både CA och IA-metoderna med ungefär samma noggrannhet, inom en faktor 2 av observerade värden för både EC_{50} och EC_{10} koncentrationer (Tabell 5). Eftersom CA-metoden har den högsta prediktionsstyrkan och är den mera konservativa av de två, föreslog författaren att den borde vara förstahandsvalet vid riskanalysen.

Tabell 5. Experimentella beräkningar av EC10, EC50 och EC90 värden för tre olika toxiska ämnen (Engell-Kofoed, 2005).

Mixture	EC_x	Predicted by CA	Experimantal EC_{50}-values	Predicted by IA	CA Underest.	CA Overest.	IA Underest.	IA Overest.	Ratio IA/CA
dimethoate/	10	10.8	9.9	11.1	1.1		1.1		1.0
pirimicarb	50	14.3	16.1	13.5		1.1		1.2	0.9
pirimicarb/	10	8.3	12.8	11.5		1.5		1.1	1.4
LAS	50	16.8	19.2	18.1		1.1		1.1	1.1
dimethoate/	10	0.9	1.6	0.9		1.7		1.7	1.0
LAS	50	1.9	1.9	1.5	1.0			1.3	0.8
dimethoate/	10	13.9	12.3	23.2	1.1		1.9		1.7
pirimicarb/	50	18.4	18.9	28.6		1.0	1.5		1.6
LAS									

Dioxiner

WHOs expertpanel (Van den Berg et al., 1998) granskade det vetenskapliga stödet, baserat på tester med däggdjur och cellkulturer av däggdjur, fisk och fågel, för användningen av TEF-metoden för bedömning av toxicitet av blandningar av polyklorerade dibenso-p-dioxiner (PCDDer), dibensofuraner (PCDFer) och dioxinliknande polyklorerade bifenyler (PCBer). Man fann att TEF fortfarande är den lämligaste metoden för denna grupp av ämnen, låt vara att det finns osäkerheter med vissa fall av icke-additiva interaktioner.

PCB

USEPA (2000b) föreslår att blandningar av PCBs bedöms med utgångspunkt från separata riskanalyser av dioxinliknande och icke-dioxinliknande ämnen, som adderas i slut-bedömningen. För analysen av toxiciteten av blandningskomponenter med dioxinliknande egenskaper föreslås RPF (Relative Potency Factor)-metoden. Den är snarlik TEF-metoden, med den skillnaden att RPF-metoden uteslutande använder data från exponering och effekt i toxicitetstester och TEF-metoden använder mekanistisk information om verknings-mekanismer för komponenterna. Båda metoderna utser en välkänd indikatorkemikalie, med vars farlighet, t.ex.effektkoncentrationen, varje enskild komponent i blandningen jämförs. Denna RPF-faktor multipliceras med en uppmätt eller beräknad koncentration av komponenten. EPA föreslår att man använder 2,3,7,8-TCDD som indikatorkemikalie för beräkning av RPF för dioxinliknande PCBs, multiplicerar koncentrationerna av komponenterna, om de är kända, med deras RPF och därefter adderar produkterna till en ekvivalent 2,3,7,8-TCDD dos. Cancerrisken på grund av de dioxinliknande PCB-erna representeras då av cancerrisken med 2,3,7,8-TCDD-dosen. För icke-dioxinliknande PCBs multipliceras den totala dosen med den linjära dos-respons-faktorn för hela PCB-blandningen, och de ekvivalenta doserna av de två grupperna av PCBs adderas för att ge cancerrisken för hela blandningen.

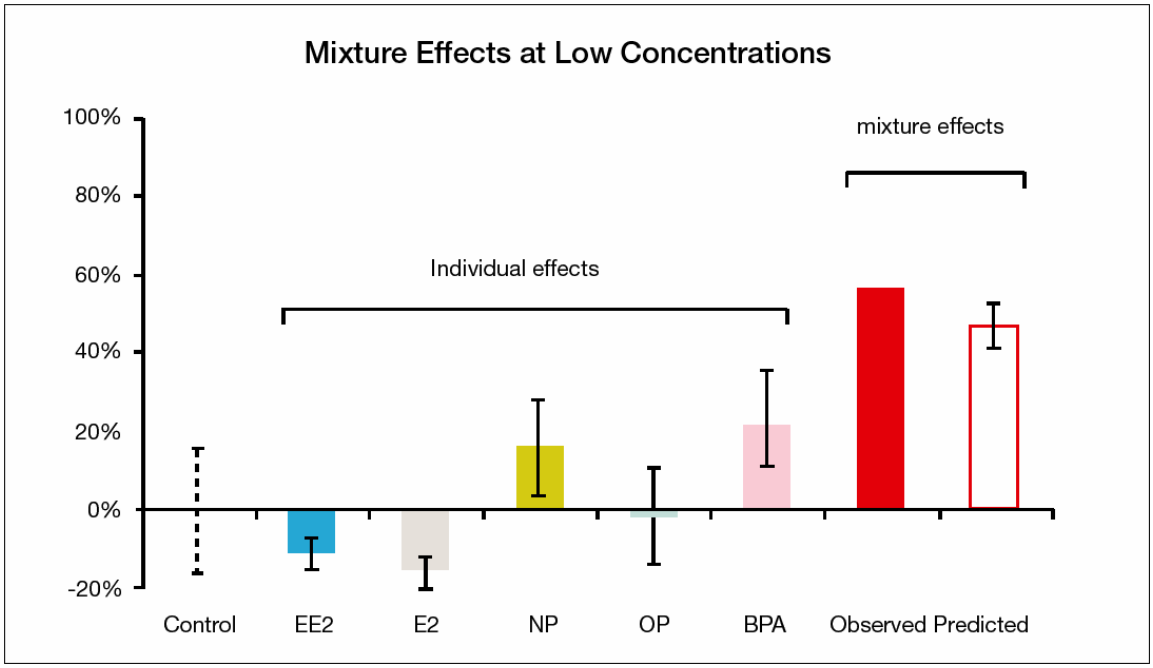
PAH

Swartz et al (1995) utvecklade en ∑PAH modell för att prediktera toxiciteten av PAHs i ett förorenat sediment med en nära 90 %-ig överensstämmelse mellan predikterade och observerade värden. Modellen byggde på ett antal successiva steg: 1) beräkning av koncentrationen av individuella PAHs i sedimentets porvatten från data för sediment-koncentrationen av PAHs, fraktionen organiskt kol i sedimentet och

jämviktsfördelningskoefficienten för PAHs (K_{oc}) mellan vattenfasen och organiskt kol-fasen; 2) beräkning av LC_{50}-värden för individuella PAHs med a) data från LC_{50}-tester för amphipoder med sediment som tillsatts endera av tre PAHs och b) regression av LC_{50} mot jämviktsfördelningskoefficienten för PAHs mellan vatttenfasen och en oktanolfas (K_{ow}), under antagande att koefficienterna för denna QSAR beräknades från testet med de tre tillsatta PAH-erna; 3) beräkning av den toxiska enheten (TU_I) för individuella PAHs som kvoten mellan porvattenkoncentrationen av PAH och dess predikterade LC_{50}-värde; 4) beräkning av TU_I för ∑PAH genom att tillämpa koncentrationsadditionsmodellen. ∑PAH-modellen testades genom att jämföra mortaliteten i sediment, både från lokaler med PAHs som dominerande föroreningskälla, och sådana som dominerades av andra föroreningar med den mortalitet som predikterades av modellen. Författarna påpekar att modellen rymmer osäkerheter /begränsad tillförlitlighet vad gäller QSAR sambandet (få data med begränsad variation av K_{ow}), akut snarare än kronisk toxicitet, och additivitet för toxiska enheter.

Hormonstörande kemiska blandningar

Många olika östrogenliknande ämnen, bl.a. ftalater, är kända från vävnadsprov av människa och fisk. Avbrott i differentieringen av hanliga könskaraktärer har använts som endpoint för tester av ternära och kvartära blandningar av östrogenliknande ämnen på råttor och zebrafisk. Blandningseffekterna kunde predikteras med koncentrationsadditions-metoden vid doser som inte gav mätbara effekter av de individuella komponenterna (The EDEN Project, 2007 #88). På samma sätt visade Silva et al. (2002) att koncentrationsaddition gav god överensstämmelse med observationer av toxicitet på jästceller av blandningar av östrogenaktiverande ämnen i koncentrationer av enskilda komponenter som var lägre än NOEC-värdet.



Figur 6. Kombinationseffekter av kemiska blandningar av östrogena kemikalier i marina och sötvettenorganismer (The ACE Project, 2007).

Den danska Miljöstyrelsen slutsats om kombinerade effekter av hormonstörande ämnen är att de bör bedömas som om de hade additiva egenskaper (Miljøstyrelsen, 2003). I Miljöstyrelsens litteraturgenomgång från 2003 finns det inga belägg för att hormonstörande ämnen verkar synergistiskt.

Brian et al. (2005) visade att 1) effekten av en blandning av östogenliknande ämnen (estradiol, etynylestradiol, nonylfenol, oktylfenol och bisfenol) på en nordamerikansk trubbnosad elritsa, fathead minnows, kunde förutsägas med koncentrationsadditions-metoden, med alla predikterade värden inom det 95%-iga konfidensintervallet för den empiriska dos-responskurvan för blandningen, och att 2) koncentrationsadditions-metoden kunde förutsäga blandningseffekten av så låga halterav de enskilda ämnena, en femtedel av EC_{50}-värdet, att deras individuella effekter inte kunde påvisas.

Slutsatser och rekommendationer

Det kan inte vara enkelt att hitta en naturlig miljö på jorden där det förekommer bara ett kemiskt ämne med påvisad eller förmodad toxisk effekt vid åtminstone någon koncentration. Man kan därför inte utesluta möjligheten att någon organism i någon bemärkelse påverkas toxiskt av mer än ett kemiskt ämne samtidigt.

Risken för toxisk påverkan på en eller flera organismer i en viss miljö bör därför analyseras och bedömas med utgångspunkt från exponering för blandningar av två eller flera kemikalier. Värdet av att bedöma toxiciteten av enskilda kemikalier utgörs av dess bidrag till beräkning och prediktion av toxiciteten av kemikalieblandningar.

Vid bedömning av toxiska risker av kemikalieblandningar som organismer exponeras för i en viss miljö rekommenderar vi att följa scheman i bilaga 1-3. De utgör kondensationer, revisioner och konstruktioner av logiska steg och arbetsmoment som föreslagits i den litteratur som rapporten redovisar. Bedömningsscheman är att betrakta som arbetsutkast, som bör granskas och värderas i praktisk handling.

Vi föreställer oss inledningsvis att bedömaren kan avgöra vilken ingång i schemat i bilaga 1 som är tillämpligt, beroende på tillgången till data, miljöbeskrivning och information i internationell litteratur. Flera typfall kan bli aktuella: 1) enkel blandning med helt känd sammansättning; 2) blandning med >10 ämnen, varav hälften eller fler är kända; 3) enkel blandning med helt okänd sammansättning; 4) komplex blandning med delvis känd sammansättning; 5) komplex blandning med okänd sammansättning.

Om blandningen är enkel och känd rekommenderar vi att bedömningen följer den högra förgreningen i schemat och i ett första steg väljer att betrakta blandningens kemikalier som likartade, oberoende av varandra eller kombinationer därav. Kan man inte vara helt säker på verkningsmekanismerna för blandningens kemikalier gör man sig inte skyldig till större fel än en konservativ överskattning av risken om blandningens alla kemikalier behandlas som additiva. Den osäkerheten om verkningsmekanismer måste vara transparent och framgå av analysen. Om man har skäl att anta eller misstänka att några av blandningens kemikalier bidrar till toxisk synergi eller antagonism kan det finnas skäl att anlita en professionell toxikolog för en specialanalys.

Om blandningen är delvis känd men inte helt enkel bör bedömningen göras i något fler steg än om blandningen vore enkel och helt känd. Först bör den nationella och internationella litteraturen om toxiska egenskaper för blandningar som innehåller flera av de kända kemikalierna in den aktuella blandningen analyseras, för att bedöma om det finns generella mönster för att extrapolera toxiska egenskaper för en blandning vars sammansättning bara delvis är känd. Det kan t ex vara så att förekomsten av en grupp PAH-er i en miljö med stor sannolikhet kan antas indikera förekomsten av ytterligare ett antal PAH-er, låt vara okända i den miljön, och att proportionen av koncentrationer av PAH-erna, kända och okända, kan uppskattas genom extrapolering.

Man kan också göra bedömningen att blandningen inte är mera komplicerad än att det är möjligt att få väsentligt mera information om sammansättningen genom en kemisk analys. För vissa grupper av kemikalier, såsom metaller, som kan analyseras med förhållandevis enkla metoder, är en sådan komplettering av data i själva verket att föredra snarare än dyra jämförande analyser av internationell litteratur.

I ett andra steg bör ett vedertaget kroniskt toxicitetstest (ur OECDs skafferi) göras på blandningen och utfallet jämföras med den toxicitet som beräknats för blandningen, med de antaganden som gjorts i bedömningsschemat om verkningsmekanismer och sammansättningen av den del av blandningen som är okänd. Hur stor skillnad som kan accepteras mellan observerad och predikterad toxicitet har vi inte möjlighet att gå in på här. Det är en fråga om hur stor osäkerhet jämförelsen rymmer (hur bra är data, modeller, statistiska metoder?) och om vilka normativa inslag bedömningen innehåller (hur mycket fel är vi beredda att låta miljön tolerera?).

För situationen med en enkel men helt okänd blandning rekommenderar vi inledningsvis en kemisk analys av blandningen. Det ökar säkerheten och inslaget av mekanistiskt baserad kunskap i riskbedömningen om åtminstone delar av den enkla blandningen kan bli kända. Därefter kan den bedömas som om den vore enkel och delvis känd.

Komplexa blandningar med delvis känd sammansättning bedöms inledningsvis efter den vänstra förgreningen av schemat i bilaga 1. Först utnyttjas informationen om den kända delen av blandningen för att avgöra om den delen utgör en grupp om tillräckligt många med likartad kemisk struktur och verkningsmekanism, om den kan karakteriseras som en grupp av de sannolikt mest riskabla kemikalierna i blandningen eller om den innehåller kemikalier som anses problematiska, med egenskaper som gör deras beteende och aktivitet svårartad,

ur miljötoxikologisk eller hälsotoxikologisk synvinkel. En subgrupp identifierad med de förmodat mest riskabla kemikalierna kan anses representera merparten av blandningens toxicitetsstyrka och bedömas som en blandning av kända ämnen i den högra förgreningen. Om tillräckligt många av blandningens kända kemikalier anses vara likartade, kan riskerna med hela blandningen bedömas med surrogatmetoden, TEF eller jämförande potensmetoden enligt de rutiner som finns i rapportens litteraturreferenser. Liksom i fallet med den enkla blandningen med delvis okänd sammansättning bör en toxicitetstest av screeningtyp göras och utfallet jämföras med den predikterade toxiciteten.

Om blandningen är komplex och mer eller mindre okänd till sammansättning rekommenderar vi att bedömningen följer den vänstra förgreningen av schemat i bilaga 1 och det mera detaljerade och beslutsträdsorienterade schemat i bilaga 2. I det inledande arbetet görs kemisk separation och karakterisering parallellt med toxicitetstester av hela blandningen. Man kan hävda att screeningtester av toxiciteten borde vara ett tillräckligt underlag för bedömningen, men det argumentet missar åtminstone två aspekter av toxiciteten av komplexa blandningar. Den ena aspekten handlar om den kunskapsackumulering som varje riskbedömning bidrar till. Utan kännedom om innehållet i den ”svarta låda” som en komplicerad blandning representerar är det svårt att bidra till ökad förståelse av blandningars toxicitet och till riskanalysens prediktionsstyrka. Den andra aspekten är den mångfald av beteenden som en komplex blandning kan ha beroende på t.ex. absoluta och relativa koncentrationer av komponenterna, pH, syrgas, och elektrisk konduktivitet. Det skulle krävas många toxicitetstester för att invändningsfritt belysa sådana omständigheter liksom olika organismers och funktioners känslighet för blandningen. Ännu mera sofistikerad och ännu mea angelägen att ta hänsyn till är interaktionen mellan kemikalien och andra stressfaktorer, t.ex. förstärkning av toxiciteten när ett bytesdjur känner doften av en potentiell predator (Relyea och Hoverman, 2006).

Som framgår av rapporten är riskbedömningen av komplexa och okända blandningar svår även när provmatrisen är relativt enkel, t.ex. ett prov av förorenad luft, på grund av ibland dålig överensstämmelse mellan identifierad sammansättning och förväntad toxicitet eller därför att toxicitetstester är svåra att genomföra på en blandning på grund av vissa av komponenternas höga toxicitet. Här finns utrymme både för utveckling och applicering av metoder, såsom fingeravtrycksanalys kombinerad med multivariat regression, och forskning för utveckling av nya metoder för både datagenerering och riskanalys. För att få ett riktmärke dit hela handen ska peka finns det anledning att citera Warne (2003):

“Because most chemicals occur in the environment as mixtures and it is known that the toxicity of mixtures is different to that of the individual components it is logical to attempt to incorporate the toxicity of mixtures into environmental quality guidelines (ie. water,soil, sediment and air quality guidelines) and into hazard and risk assessments.The vast majority of hazard and risk assessments do not directly address the toxicity of the mixtures that are encountered, rather they conduct the analyses on each of the individual chemicals. However, there is no reason why the toxicity of the mixtures cannot be addressed in at least a conservative manner (ie. assuming concentration additivity). There is no excuse for not considering the toxicity of mixtures in hazard and risk assessments. The adoption of such an approach for human health issues would not be accepted, and nor should it be for the environment. To do so is to knowingly underestimate the hazard or risk and therefore under-protect the environment.”

Handlingsplan

Vi rekommenderar Naturvårdsverket att i alla avseenden, i anvisningar, lagrum, förhandlingar, informationsmaterial, osv, verka för att riskbedömningen av toxiciteten av kemikalier för miljö och hälsa görs med utgångspunkt från att en toxisk kemikalie sällan eller aldrig uppträder som ensam toxisk kemikalie i sammanhang där det finns förutsättningar för exponering. Det innebär bl.a. att vid bedömning av avloppsutsläpp, avgas- och process-industriemissioner, förorenad mark, tillståndsärenden för pesticider, läkemedel, färgämnestillsatser, osv, dokumentationen måste omfatta kemiska analyser av kända/förväntade/ misstänkta toxiska ämnen i de miljöer som bedömningen ska göras för. Den vetenskapliga dokumentationen av toxicitet av kemikalier är, liksom bedömningskriterier som tillämpas av evidensfixerade miljömyndigheter i flera andra länder, överväldigande stöd för ett sådant förhållningssätt.

För att öka förståelsen för toxicitet av kemikalier i blandningar och öka kunskapen om riskbedömning och i synnerhet implementeringen av den i konkreta fall, rekommenderas Naturvårdsverket att ordna utbildning och träning i riskbedömningen av kemikalie-blandningar. Utbildningen kan lämpligen fokusera på praktiska övningar för bedömning av olika kemikaliegrupper, där det finns solid vetenskaplig information om verknings-mekanismer, kryddat med något aktuellt fall med mer eller mindre kända komplexa blandningar.

En manual med bedömningskriterier, räkneexempel och beslutsträd för analysgången bör utarbetas för att kunna användas av personal hos statliga och regionala myndigheter, hos konsultföretag, m fl för bedömning av hälso- och miljörisker förknippade med mer eller mindre komplicerade blandningar av kemikalier. Manualen bör i första hand vara elektroniskt tillgänglig så att den lätt kan uppgraderas när ny vetenskaplig information tillförs området.

Naturvårdsverket bör formalisera en extern stödfunktion (expertgrupp) för riskbedömning av kemikalieblandningar, gärna en som ger stöd åt flera myndigheter (Kemikalieinspektionen, Livsmedelsverket, Jordbruksverket, etc) samtidigt och som kan anlitas i första hand för bedömningar då expertkunskap underlättar. En utgångspunkt kan vara Toxikologiska rådet vid Kemi.

Naturvårdsverket bör ta initiativ till att modernisera och kvalificera de metoder med vilka riskbedömningen av kemikalieblandningar beräknas och kvantifieras. De index med vilka risker uttrycks är uppenbarligen inte riskmått – framför allt ger de ingen information om någon typ av osäkerhet i analyser och bedömningar. Naturvårdsverket skulle kunna ge uppdrag åt forskningssamhället att utveckla denna stödfunktionen och samtidigt stärka den svenska riskforskningsprofilen inom miljö och hälsa.

Det finns grupper av kemikalier för vilka de nuvarande bedömningsgrunderna och riskanalysmetoderna är otillräckliga, bl.a. för att kemikalierna är strukturellt heterogena, har olika verkningsmekanismer, uppträder i grupper i miljön med mycket stor spännvidd i koncentration av enskilda komponenter och har dåligt dokumenterad toxicitet i miljön. Till sådana grupper räknar vi läkemedelssubstanser. Vår bedömning är att det vetenskapliga stödet för riskbedömning av dem, som enskild grupp och i kombination med andra kemikaliegrupper, är väldigt tunnt. Därför föreslår vi att Naturvårdsverket, gärna i samarbete med andra, internationella miljövårdsmyndigheter, försöker utveckla bästa möjliga bedömningsgrunder, genom att man vrider och vänder och tänjer på den information och praxis som redan finns.

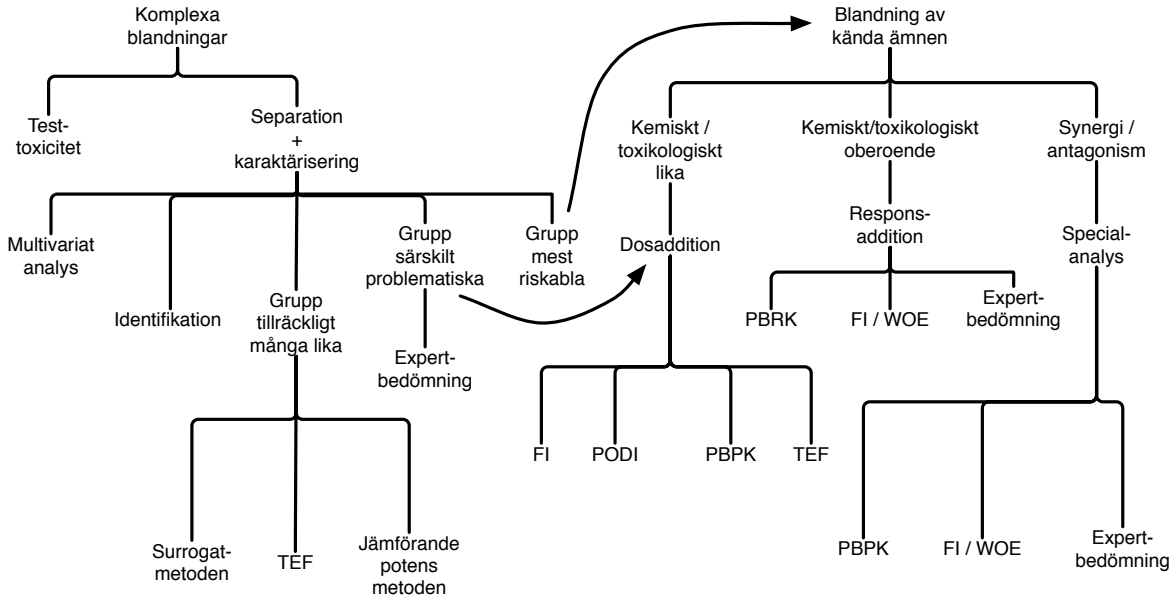
Bilagor

Bilaga 1: Schematisk analysgång för bedömning av toxiciteten av komplexa blandningar och blandningar med känd sammansättning.

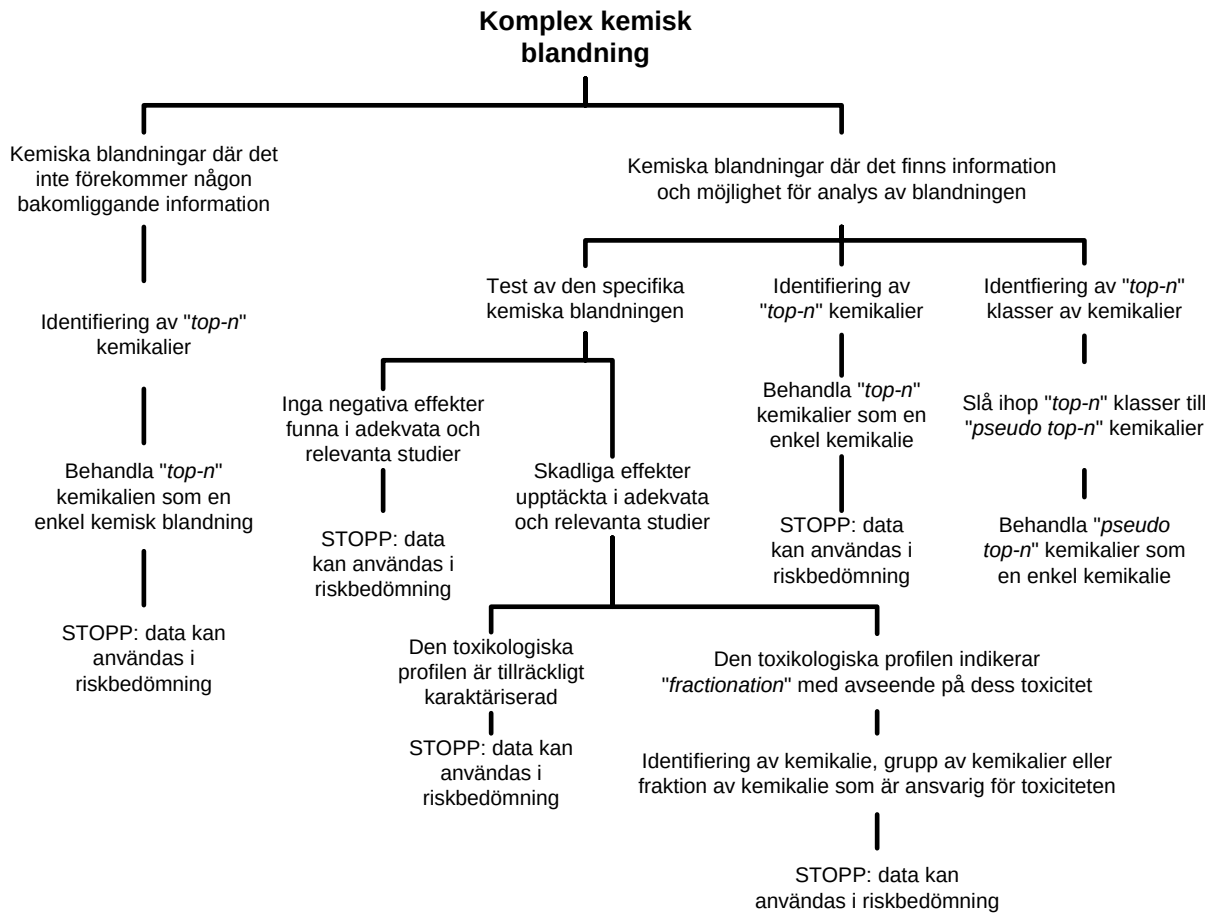
Bilaga 2: Strategi för bedömning av toxicitet av komplexa kemiska blandningar baserad på identifikation av de n mest riskabla komponenterna i blandningen ("top-n") från Groten et al. (2001).

Bilaga 3: Beslutsträd för bedömning av toxicitet av kemikalieblandningar från Committee on toxicity of chemicals in food (2007).

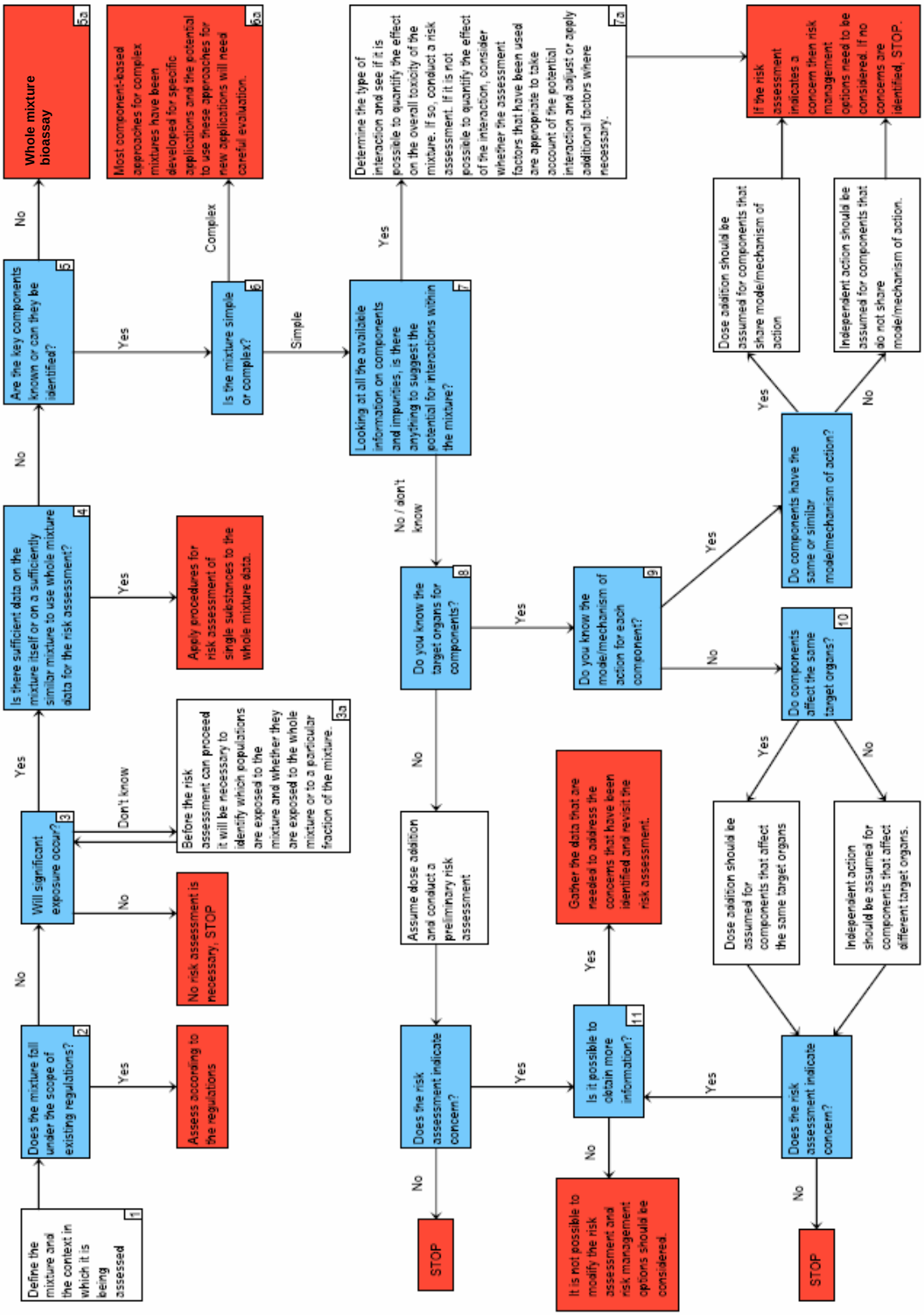
Bilaga 1


Komplexa blandningar
Test-toxicitet
Separation + karaktärisering
Multivariat analys
Identifikation
Grupp tillräckligt många lika
Grupp särskilt problematiska
Grupp mest riskabla
Expert-bedömning
Surrogat-metoden
TEF
Jämförande potens metoden
Blandning av kända ämnen
Kemiskt / toxikologiskt lika
Kemiskt/toxikologiskt oberoende
Synergi / antagonism
Dosaddition
Respons-addition
Special-analys
FI
PODI
PBPK
TEF
PBRK
FI / WOE
Expert-bedömning
PBPK
FI / WOE
Expert-bedömning

Bilaga 2


Komplex kemisk blandning
Kemiska blandningar där det inte förekommer någon bakomliggande information
Kemiska blandningar där det finns information och möjlighet för analys av blandningen
Identifiering av "top-n" kemikalier
Behandla "top-n" kemikalien som en enkel kemisk blandning
STOPP: data kan användas i riskbedömning
Test av den specifika kemiska blandningen
Identifiering av "top-n" kemikalier
Identfiering av "top-n" klasser av kemikalier
Inga negativa effekter funna i adekvata och relevanta studier
STOPP: data kan användas i riskbedömning
Skadliga effekter upptäckta i adekvata och relevanta studier
Behandla "top-n" kemikalier som en enkel kemikalie
STOPP: data kan användas i riskbedömning
Slå ihop "top-n" klasser till "pseudo top-n" kemikalier
Behandla "pseudo top-n" kemikalier som en enkel kemikalie
Den toxikologiska profilen är tillräckligt karaktäriserad
STOPP: data kan användas i riskbedömning
Den toxikologiska profilen indikerar "fractionation" med avseende på dess toxicitet
Identifiering av kemikalie, grupp av kemikalier eller fraktion av kemikalie som är ansvarig för toxiciteten
STOPP: data kan användas i riskbedömning

Bilaga 3


1
Define the mixture and the context in which it is being assessed
2
Does the mixture fall under the scope of existing regulations?
Yes
Assess according to the regulations
No
3
Will significant exposure occur?
Yes
Don't know
3a
Before the risk assessment can proceed it will be necessary to identify which populations are exposed to the mixture and whether they are exposed to the whole mixture or to a particular fraction of the mixture.
No
No risk assessment is necessary, STOP
4
Is there sufficient data on the mixture itself or on a sufficiently similar mixture to use whole mixture data for the risk assessment?
Yes
Apply procedures for risk assessment of single substances to the whole mixture data.
No
5
Are the key components known or can they be identified?
Yes
No
5b
Whole mixture bioassay
6
Is the mixture simple or complex?
Complex
6a
Most component-based approaches for complex mixtures have been developed for specific applications and the potential to use these approaches for new applications will need careful evaluation.
Simple
7
Looking at all the available information on components and impurities, is there anything to suggest the potential for interactions within the mixture?
Yes
7a
Determine the type of interaction and see if it is possible to quantify the effect on the overall toxicity of the mixture. If so, conduct a risk assessment. If it is not possible to quantify the effect of the interaction, consider whether the assessment factors that have been used are appropriate to take account of the potential interaction and adjust or apply additional factors where necessary.
If the risk assessment indicates a concern then risk management options need to be considered. If no concerns are identified, STOP.
No / don't know
8
Do you know the target organs for components?
Yes
No
Assume dose addition and conduct a preliminary risk assessment
Does the risk assessment indicate concern?
Yes
No
STOP
9
Do you know the mode/mechanism of action for each component?
Yes
No
Do components have the same or similar mode/mechanism of action?
Yes
Dose addition should be assumed for components that share mode/mechanism of action
No
Independent action should be assumed for components that do not share mode/mechanism of action.
10
Do components affect the same target organs?
Yes
Dose addition should be assumed for components that affect the same target organs
No
Independent action should be assumed for components that affect different target organs.
Does the risk assessment indicate concern?
No
STOP
Yes
11
Is it possible to obtain more information?
Yes
Gather the data that are needed to address the concerns that have been identified and revisit the risk assessment.
No
It is not possible to modify the risk assessment and risk management options should be considered.

Referenser

Abdelghani, A.A. et al., 1997. Toxicity evaluation of single and chemical mixtures of roundup, Garlon-3A, 2, 4-D and Syndets Surfactant to channel catfish (Ictalurus punctatus), bluegill sunfish (Lepomis microchirus), and crawfish (Procambarus spp.). Environmental toxicology and water quality, 12(3): 237-243.

Alabaster, J.S., Shurben, D.G. and Mallett, M.J., 1983. The acute lethal toxicity of mixtures of cyanide and ammonia to smolts of salmon, Salmo salar L. at low concentrations of dissolved oxygen. Journal of Fish Biology, 22(2): 215-222.

Altenburger, R., Boedekers, W., Faust, M. and Grimmes, H.L., 1996. Regulations for Combined Effects of PoIllutants: Consequences From Risk Assessment in Aquatic Toxicology Food and Chemical Toxicology, 34: 1155-1157.

Altenburger, R., Nendza, M. and Schüürmann, G., 2003. Mixture Toxicity and its Modeling by Quantitative Structure - Activity Relationships Environmental Toxicology and Chemistry, 22(8): 1900-1915.

Altenburger, R., Walter, H. and Grote, M., 2004. What Contributes to the Combined Effect of a Complex Mixture? Environ. Sci. Technol., 38: 6353-6362.

Arbetsmiljöverket, 2005. Hygieniska gränsvärden och åtgärder mot luftföroreningar.

Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, 2000. Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality, Canberra.

Backhaus, T. et al., 2003. The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. Continental Shelf Research, 23: 1757-1769.

Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M. and Scholze, M., 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to Vibrio fischeri. Environmental Toxicology and Chemistry, 19: 2348-2356.

Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. Annals of Applied Biology, 26: 585-615.

Borgert, C.J., Price, B., Wells, C.S. and Simon, G.S., 2001. Evaluating Chemical Interaction Studies for Mixture Risk Assessment. Human and Ecological Risk Assessment, 7(2): 259-306.

Borgert, C.J., Quill, T.F., McCarty, L.S. and Mason, A.M., 2004. Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? Toxicology and Apllied Pharmacology, 201: 85-96.

Bostrøm, E., Engen, S. and Eide, I., 1998. Mutagenicity testing of organic extracts of diesel exhaust particles after spiking with polycyclic ariomatic hydrocarbons (PAH). Archives of Toxicology 72: 645-649.

Boxall, A.B.A. and Matltby, L., 1997. The Effects of Motorway Runoff on freshwater Ecosystems: 3 Toxicant Confirmation. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 33: 9-16.

Brian, J.V. et al., 2005. Accurate Prediction of the Response of Freswater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals. Environmental Health Perspective, 113(6): 721-728.

Broderius, S.J. and Kahl, M., 1985. Acute toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow. Aquatic Toxicology, 6(4): 307-322.

Chaturvedi, A.K., 1993. Toxicological evaluation of mixtures of ten widely used pesticides. Journal of Applied Toxicology, 13: 183-188.

Chen, C.Y. and Chiou, Y.S., 1995. Toxicity of binary mixtures of organic chemicals. Environmental Toxicology and Water Quality, 10(2): 97-106.

Chen, J. et al., 1996. Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity studies of heterocyclic nitrogen compounds. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 57(1): 77-83.

Cizmas, L. et al., 2004. Toxicity Characterization of Complex Mixtures Using Biological and Chemical Analysis in Preparation for Assessment of Mixture Similarity. Environ. Sci. Technol., 38: 5127-5133.

Committee on toxicity of chemicals in food, c.p.a.t.e., 2007. Interdepartmental group on health risks from chemicals (IGHRC) draft guidance document on "Chemical Mixtures: A Framework for Assessing Risks", COT.

De Zwart, D. and Sloof, W., 1987. Toxicity of heavy metals and petrochemicals to *Xenopus laevis*. Bull Environ Contam Toxicol, 38: 345-351.

Deneer, J.W., 2000. Toxicity of mixtures of pesticides in aguatic systems. Pest Management Science, 56: 516-520.

Deneer, J.W., Sinnige, T.L., Seinen, W. and Hermens, J.L.M., 1988. The joint acute toxicity to *Daphnia magna* of industrial organic chemicals at low concentrations Aquatic Toxicology, 12: 33-38.

Donnelly, K.C., Brown, K.W., Kampbell, D., 1987. Chemical and biological characteriza-tion of hazardous industrial waste . I. Prokaryotic bioassays and chemical analysis of a wood-preserving bottom-sediment waste. Mutation Research, 180: 31-42.

Drescher, K. and Boedeker, W., 1995. Assessment of the Combined Effects of Substances: The Relationship between Concentration Addition and Independent Action. Biometrics, 51(2): 716-730.

Eide, I. et al., 2004. Toxicological evaluation of complex mixtures: fingerprinting and multivariate analysis. Environmental Toxicology and Pharmacology, 18: 127-133.

Engell-Kofoed, A.E., 2005. Single substance and mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to Daphnia magna. Master Thesis Thesis, Roskilde University, Roskilde, 44 pp.

Europaparlamentet, 2006. EUROPAPARLAMENTETS OCH RÅDETS FÖRORDNING (EG nr 1907/2006 av den18 december 2006 omregistrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionensförordning (EG)nr1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG. In: Europaparlamentet (Editor).

European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, 2001. Aquatic Toxicity of Mixtures. No. 80, Brussels.

European Commission, 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commision Regualtion (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment for existing substances Directive 98/8/EC of the European Parliment and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II, European Commission.

Faust, M. et al., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multicomponent s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. Aquatic Toxicology, 56: 13-32.

Fent, K. and Bätscher, R., 2000. Cytochrome P4501A Induction Potencies of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Fish Hepatoma Cell Line: Demenstration of Additive Interactions. Environmental Toxicology and Chemistry, 19(8): 2047-2058.

Feron, V.J., Cassee, F.R. and Groten, J.P., 1998. Toxicology of chemical mixtures: interna-tional perspective. Environmental Health Perspectives, 106(6): 1281-1289.

Forget, J. and Bocquené, G., 1999. Joint action of combinations of pollutants (pesticides and metals) on the LC50 values and on the acetylcholinesterase activity of Tigriopus brevicornis. Environmental Toxicology and Chemistry (#).

Goldstein, L.S. et al., 1998. Tumors and DNA adducts in mice exposed to benzo(a)pyrene and coal tars: implications for risk assessment. Environmental Health Perspectives, 106: 1325-1330.

Gramatica, P. et al., 2001. QSAR approach for the selection of congeneric compounds with a similar toxicological mode of action. Chemosphere, 42: 873-883.

Groten, J.P., Feron, V.J. and Sühnel, J., 2001. Toxicology of simple and complex mixtures. Pharmacological Sciences, 22(6).

Haddad, S., Béliveau, M., Tardif, R. and Krishnan, K., 2001. A PBPK Modeling-Based Approach to Account for Interactions in the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. Toxicological Science, 63: 125-131.

Haddad, S., Charest-Tardif, G., Tardif, R. and Krishnan, K., 2000. Validation of Physiological Modeling Framework for Simulating the Toxicokinetics of Chemicals in Mixtures. Toxicology and Applied Pharmacology, 167: 199-209.

Hansen, H., De Rosa, C.T., Pohl, H., Fay, M. and Mumtaz, M., 1998. Public Health Challenges Posed by Chemical Mixtures. Environmental Health Perspective, 106(S6): 1271-1280.

Heindel, J.J. et al., 1994. Assessment of the reproductive and developmental toxicity of pesticide/fertilizer mixtures based on confirmed pesticide contamination in California and Iowa groundwater. Fundamental and Applied Toxicology 22: 605-621.

Hermens, J., Broekhuyzen, E., Canton, H. and Wegman, R., 1985a. Quantitative Structure Activity Relationships and Mixture Toxicity Studies of Alcohols and Chlorohydrocarbons: Effects on Growth of *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, 6(3).

Hermens, J., Canton, H., Steyger, N. and Wegman, R., 1984. Joint effects of a mixture of 14 chemicals on mortality and inhibition of reproduction of. Daphnia magna: Aquat Toxicol, 5: 315-322.

Hermens, J., Könemann, H., Leeuwangh, P. and Musch, A., 1985b. Quantitative structure-activity relationships in aquatic studies of chemicals and complex mixtures of chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry, 4: 273-279.

Hermens, J. and Leeuwangh, P., 1982. Joint toxicity of mixtures of 8 and 24 chemicals to the guppy (*Poecilia reticulata*). Ecotoxicol Environ Saf, 6(3): 302-10.

Hertzberg, R.C. and Teuschler, L.K., 2002. Evaluating Quantitative Formulas for Dose-Response Assessment of Chemical Mixtures. Environmental Health Perspective, 110(6): 965-970.

Ito, N. et al., 1995. Effect of ingestion of 20 pesticides in combination at acceptable daily intake levels on rat liver carcinogenesis. Food and Chemical Toxicology, 33: 159-163.

Jak, R.G., Maas, J.L. and Scholten, M.C.T., 1996. Evaluation of Laboratory Derived Toxic Effect Concentrations of a Mixture of Metals by Testing Fresh Water Plankton Communities in Enclosures. Wat. Res., 30(5): 1215-1227.

Klein Reffstrup, T., 2002. Combined actions of pesticides in food, Institute of food safety and nutrition, Søborg.

Kligerman, A.D. et al., 1993. Analyses of cytogenetic damage in rodents following exposure to simulated groundwater contaminated with pesticides and a fertilizer. Mutat. Research, 300: 125-134.

Kraak, M.H.S., 1999. Short-Term Ecotoxicity of a Mixture of Five Metals to the Zebra Mussel Dreissena polymorpha. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 63(6): 805-812.

Krishnan, K., Haddad, S., Béliveau, M. and Tardif, R., 2002. Physiological Modeling and Extrapolation of Pharmacokinetic Interactions from Binary to More Complex Chemical Mixtures. Environmental Health Perspective, 110(6): 989-994.

Leisenring. W and Ryan, L., 1992. Statistical properties of the NOAEL. Regul. Toxicol. Pharmacol, 15(2 Pt 1): 161-171.

Liao, k.H. et al., 2002. Application of Biologically Based Computer Modeling to Simple or Complex Mixtures. Environmental Health Perspective, 110(6): 957-963.

Loewe, S. and Muischnek, H., 1926. Über Kombinationswirkungen. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 114: 313-326.
Macek, K.J., 1975. Acute toxicity of pesticide mixtures to bluegills. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 14(6): 648-652.
Marr, J.C.A. et al., 1998. Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival. Aquatic Toxicology, 43(4): 225-238.
Matthiessen, P., Whale, G.F., Rycroft, R.J. and Sheahan, D.A., 1988. Joint Toxicity of Pesticide Tank-Mixes to Rainbow Trout. Aquatic Toxicology AQTODG, 13(1).
McCarty, L.S. and Mackay, D., 1993. Enhancing Ecotoxicological Modeling and Assessment. Environ. Sci. Technol., 27(9): 1719-1728.
Mileson, B.E. et al., 1998. Common Mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus Pesticides. Toxicological Science, 41: 8-20.
Miljøstyrelsen, 2003. Combined Actions and Interactions of Chemicals in Mixtures. The Toxicological Effects of Exposure to Mixtures of Industrial and Environmental Chemicals, The Danish Veterinary and Food Administration, Köpenhamn.
Monosson, E., 2005. Chemical Mixtures: Considering the Evolution of Toxicology and Chemical Assessment. Environmental Health Perspective, 113(4): 383-390.
Moreau, C.J., 1999. Interaction Between Phenanthrene and Zinc in Their Toxicity to the Sheepshead Minnow (Cyprinodon variegatus). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 37(2): 251-257.
Mumtaz, M.M., Sipes, I.G., Clewell, H.J. and Yang, R.S.H., 1993. Risk assessment of chemical mixtures: biologic and toxicologic issues. Fundamental and Applied Toxicology, 21: 258-269.
Nirmalakhandan, N., Arulgnanendran, V., Moshin, M., Sun, B. and Cadena, F., 1994. Toxicity of Mixture of Organic Chemicals to Microorganisms. Wat. Res., 28(3): 543-551.
Pantani, C., Ghetti, P.F., Cavacini, A. and Muccioni, P., 1990. Acute toxicity of equitoxic binary mixtures of some metals, surfactants and pesticides to the the freshwater amphipod Gammarus italicus geodm. Environmental Technology, 11: 1143-1146.
Pape-Lindstrom, P.A. and Lydy, M.J., 1997. Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model. Environmental Toxicology and Chemistry, 16(11): 2415-2420.
Payne, J., Scholze, M. and Kortenkamp, A., 2001. Mixtures of Four Organo chlorines Enhance Human Breast Cancer Cell Proliferation. Environmental Health Perspectives, 109(4): 391-397.
Plackett, R.L. and S., H.P., 1948. Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides. Annals of Applied Biology, 35: 347-358.
Rajapakse, N., Ong, D. and Kortenkamp, A., 2001. Defining the Impact of weakly Estrogenic Chemicals on the Action of Steroidal Estrogens. Toxicological Science, 60: 296-304.
Relyea, R. and Hoverman, J., 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in fresh water systems. Review and Synthesis, 9: 1157-1171.
Rider, C.V. and LeBlanc, G.A., 2005. An intergrated Addition and Interaction Model for assessing Toxicity of Chemical Mixtures. Toxicological Science, 87(2): 520-528.
Riksdagen, 2001. Förordningen (2001:554) om miljökvalitetsnormer för fisk- och musselvatten.
Robert, D.W. and Marshall, S.J., 1995. Application of hydrophobicity parameters for prediction of acute aquatic toxicity of commersial surfactant mixtures. SAR and QSAR in Environmental Research 4: 167-176.
Ross, H.L.B., 1996. The interaction of chemical mixtures and their implications on water quality guidelines. Hons Thesis Thesis, University of Technology, Sydney, NSW, Australia, 167 pp.
Ross, H.L.B. and Warne, M.S.J., 1997. Most chemical mixtures have additive aquatic toxicity, Proceedings of the Third Annual Conference of the Australasian Society for Ecotoxicology, 17-19 July, Brisbane, pp. 30.

Roy, R. and Campbell, P.G.C., 1995. Survival time modeling of exposure of juvenile atlantic salmon (Salmo salar) to mixtures of aluminum and zinc in soft water at low pH. Aquatic Toxicology, 33(2): 155-176.

Schuetzle, D. and Lewtas, J., 1986. Bioassay-directed chemical analysis in environmental research. Analytical Chemistry 58.

Sexton, K. and Hattis, D., 2007. Assessing Cumulative Health Risks from Exposure to Environmental Mixtures - Three Fundamental Questions. Environmental Health Perspective, 115(5): 825-832.

Silva, E., Rajapaksse, N. and Kortenkamp, A., 2002. Something from “Nothing” - Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOECs Produce Significant Mixture Effects. Environ. Sci. Technol., 36: 1751-1756.

Spehar, R.L. and Fiandt, J.T., 1986. Acute and chronic effects of water quality criteria-based metal mixtures on three aquatic species. Environmental Toxicology and Chemistry, 5(10): 917-931.

Swartz, R.C. et al., 1995. PAH: A model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments. Environmental Toxicology and Chemistry, 14(11): 1977-1987.

Tarcher, A.B., 1992. The occupational and environmental health history. In: A.B. Tarcher (Editor), Principles and Practices of Environmental Medecine. Plenum Medical Book Company, New York, pp. 175-188.

Teisseire, H., Couderchet, M. and Vernet, G., 1999. Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*). Environmental Pollution, 106(1): 39-45.

The ACE Project, 2007. Analysing combination effects of mixtures of oestrogenic chemicals in marine and freshwater organisms, EU Research on Environmental and Health.

U.S. Environmental Protection Agency, 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.

U.S. Environmental Protection Agency, 2003. Framework for Cumulatative Risk Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460.

Walter, H., Consolaro, F., Gramatica, P., Scholze, M. and Altenburger, R., 2002. Mixture Toxicity of Priority Pollutants at No Observed Effect Concentrations (NOECs). Ecotoxicology, 11: 299-310.

Van den Berg, M. et al., 1998. Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife. Environmental Health Perspective, 106(12): 775-792.

Van Der Geest, H.G., Greve, G.D., Boivin, M.E., Kraak, M.H.S. and Van Gestel, C.A.M., 2000. Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly (*Ephoron virgo*) judging additivity at different effect levels. Environmental Toxicology and Chemistry, 19(12): 2900-2905.

Warne, M.S.J., 2003. A Review of the Ecotoxicity of Mixture, Approaches to, and Recommendations for, their Management. In: A. Langeey, M. Gilbey and B. Kennedy (Editors), Proceedings of the Fifth national Workshop on the Assessment of the Site Contamination. National Environment Protection Council, pp. 253-276.

Warne, M.S.J., Connel, D.W., Hawker, D.W. and Schüürmann, G., 1989. Prediction of the toxicity of mixtures of Shale Oil componenets. Ecotoxicology and Environmental Safety 18: 121-128.

Warne, M.S.J. and Hawker, D.W., 1995. The number of Components in a Mixture Determines Whether Synergistic and Antagonistic or Additive toxicity Predominate - the Funnel Hypothesis." Ecotoxicology and Environmental Safety, 31(1): 23-28.

Warne, M.S.J. and Schifko, A.D., 1999. Toxicity of Laundry Detergent Components to a Freshwater Cladoceran and Their Contribution to Detergent Toxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety, 44(2): 196-206.

Wei, D.B., Zhai, L.H. and Hu, H.-Y., 2004. QSAR-based toxicity classification and prediction for single and mixed aromatic compounds. SAR and QSAR in Environmental Research, 15(3): 207-216.

Verhaar, H.J.M. et al., 1997. A Proposed Approach to Study the Toxicology of Complex Mixtures of Petroleum Products: The Integrated Use of QSAR, Lumping Analysis and PBPK/PD Modeling. Environmental Health Perspective, 105(1): 179-195.

Vighi, M. and Calamari, D., 1996. Quality objectives for aquatic life: The problem of mixtures of chemical substances. Human. Ecol. Risk Assess., 6: 412-418.

Wilkinson, C.F. et al., 1999. Assessing the Risk of Exposures to Multiple Chemicals with a Common Mechanism of Toxicity: How to Cumulate? Regulatory Toxicology and Pharmacology, 31: 30-43.

Xu, S. and Nirmalakhandan, N., 1998. Use of QSAR models in predicting joint effects in multi-component mixture of organic chemicals. Water Resources, 32: 2391-2399.

Yang, R.S.H., 1994. Toxicology of chemical mixtures. Academic Press, San Diego.

Yang, R.S.H. et al., 2004. Chemical mixture toxicology: from descriptive to mechanistic, and going on to in silico toxicology. Environmental Toxicology and Pharmacology, 18: 65-81.

Yang, R.S.H. and Rauckman, E.J., 1987. Toxicological studies of chemical mixtures of environmental concern at the National Toxicology Program: health effects of ground water contaminants. Toxicology, 47: 15-34.

Østby, L., Engen, S., Melbye, A. and Eide, I., 1997. Mutagenicity testing of organic extracts of diesel exhaust particles after fractionation and recombination. Archives of Toxicology, 71: 314-319.