

## Appendix C: Combination toxicity

Category: Plant protection products

# Assessment of the toxicity of combination products for organisms

## 1. Introduction

Combination toxicology is assessed for formulations containing more than one active substance, and for combinations of products, which are made according to the Instructions for Use as a tank mixture.

In chapter 2 the risk assessment of combination of products is presented.

In appendix 1 the theoretical background of combination toxicology is described and the results of experimental research are presented. This is mainly related to aquatic organisms, on which relatively much research have been done. Furthermore is looked at the question in which cases concentration-addition or partial addition is applicable.

## 2. Risk assessment

From the information in Appendix 1 it can be concluded that it is not well known how much active substances add to combination toxicology. The available data show that also in the case of partial addition the extent of combination toxicology does not deviate much from concentration-addition. On basis of these two considerations Ctgb assumes concentration-addition in the assessment of the toxicity of combination of products. Based on the precautionary principle, concentration-addition is assumed also for other organisms.

For Plant protection products the TER (Toxicity-Exposure Ratio) is used as a standard in the risk assessment (except for bees and other non-target arthropods, where HQ-values are calculated). The TER must be higher than a trigger value to comply with the standards.

For the risk assessment of products containing more than one active substance and for tank mixtures the following formula is used:

$$\text{trigger}_{\text{substance 1}} / \text{TER}_{\text{substance 1}} + \text{trigger}_{\text{substance 2}} / \text{TER}_{\text{substance 2}} + \text{trigger}_{\text{substance i}} / \text{TER}_{\text{substance i}}$$

When for each substance the trigger values are equal, the combined TER value can be calculated according to:

$$\text{TER}_{\text{combi}} = \text{trigger} / ((\text{trigger} / \text{TER}_{\text{substance 1}}) + (\text{trigger} / \text{TER}_{\text{substance 2}}) + (\text{trigger} / \text{TER}_{\text{substance 3}}))$$

An acceptable risk is expected when  $\text{TER}_{\text{combi}} > \text{trigger}$ .

In case of unequal triggers, the combined TER value can be calculated using the following formula:

$$\text{Trigger}_{\text{combi}} = \text{trigger}_{\text{substance 1}} / \text{trigger}_{\text{substance 2}} / \text{trigger}_{\text{substance i}}$$
$$\text{TER}_{\text{combi}} = \text{trigger}_{\text{combi}} / ((\text{trigger}_{\text{substance 1}} / \text{TER}_{\text{substance 1}}) + (\text{trigger}_{\text{substance 2}} / \text{TER}_{\text{substance 2}}) + (\text{trigger}_{\text{substance i}} / \text{TER}_{\text{substance i}}))$$

An acceptable risk is expected when  $\text{TER}_{\text{combi}} > \text{trigger}_{\text{combi}}$ .

In this formula, 'triggers' are the trigger values as mentioned in the corresponding chapter of the Evaluation Manual.

In case toxicity of the formulation has been measured, the TER-value of the formulation is calculated with the PEC of the formulation and the toxicity value of the formulation. The PEC of the formulation is the sum of the PECs of the individual active substances.

The toxicity value of the formulation is expressed in total amount active substance. Trigger/TER must be smaller than 1.

In the risk assessment, the risk of combination toxicology is assessed using the highest trigger/TER-value from the one based on the sum of the individual substances and the one based on formulation studies. When the standard of 1 is breached, the product is not permissible, unless an adequate risk assessment shows that there are no unacceptable effects under field conditions after application of the product according to the proposed GAP.

For bees and non-target arthropods HQ-values are calculated in the assessment. These values may be summed up for the different active substances and related to the trigger (for bees the trigger is 50 and for non-target arthropods the trigger is 2 in the first tier assessment and 1 in the case of extended laboratory tests. If the summed HQ-value is lower than the trigger value, the risk is acceptable. If this is not the case the product is not permissible, unless an adequate risk assessment shows that there are no unacceptable effects under field conditions after application of the product according to the proposed GAP.

*Additional remarks:*

- The ratio between the concentrations of the active substances in a product will change, because the active substances will behave in a different way in the environment after application, dependent on the characteristics of the compounds and the environment (half-life and sorption will differ for each active).
- For Plant protection products only acute data among themselves and chronic data among themselves may be combined. Different tiers of assessment may be combined (e.g. an acute HC5 for active substance 1 and an acute LC50 for active substance 2).
- If the difference in toxicity of the active substances for the different species is large (more than a factor of 100) and the calculated PEC-values are in the same order of magnitude, it is not necessary to estimate the combined effect. In that case the risk assessment is based on the most toxic active substance.

## Appendix 1 Background information to the concept of combination toxicology: (In Dutch)

---

### 1. Theoretische achtergrond mengseltoxiciteit

Indien de toxiciteit wordt gebaseerd op onderzoek aan de afzonderlijke actieve stoffen, kan de gezamenlijke toxiciteit worden geschat op basis van vier typen interacties (naar Könemann, 1981):

1. de stoffen verzwakken de toxische effecten van elkaar (antagonisme)
2. de stoffen werken volledig onafhankelijk van elkaar (non-additie)
3. de werking van de éne stof draagt bij aan die van de andere stof(fen). Die bijdrage kan volledig zijn (concentratie-additie), of gedeeltelijk (partiële additie)
4. de werking van de éne stof versterkt het toxische effect van de andere zodanig dat het combinatie-effect meer is dan de som der afzonderlijke effecten (potentiëring, supra-additie, synergisme).

Op theoretische gronden wordt verondersteld dat actieve stoffen met eenzelfde of zeer vergelijkbaar werkingsmechanisme (bijvoorbeeld een mengsel van twee O-P ester insecticiden of een O-P ester en een carbamaat) de mengseltoxiciteit tot stand komt via concentratie-additie.

In het onderstaande wordt ingegaan op onderzoek naar de toxiciteit van combinaties van toxische stoffen voor *waterorganismen* (hieraan is relatief veel onderzoek uitgevoerd).

#### 1.1 Toxic-Unit-model

Voor waterorganismen geldt dat de toxiciteit (M) van een mengsel van verschillende stoffen is vast te stellen door de concentratie van de afzonderlijke stoffen ( $C_i$ ) uit te drukken als fractie van een effect-parameter, meestal de  $LC_{50}$  of  $EC_{50}$ . De mengseltoxiciteit M bedraagt dan  $\sum C_i / L(E)C_{50}$ . Deze wordt uitgedrukt in toxic units (TU).

In het geval van concentratie-additie treedt 50% effect op bij  $M=1,0$  TU, onafhankelijk hoeveel stoffen in het mengsel zitten. In het geval van partiële additie zal 50% effect worden gevonden bij  $1,0 < M < n$ . Hierbij is n het aantal stoffen in het mengsel. De exacte waarde van M is te berekenen indien de dosis-respons relaties van de afzonderlijke stoffen bekend zijn. In het geval van non-additie is  $M = n$  bij 50% effect. In het geval van antagonisme en potentiëring neemt M waarden aan van respectievelijk  $> 1,0$  tot  $< 1,0$ .

Hieronder wordt ingegaan op concentratie- en partiële additie als onderliggende verklaring van de toxiciteit van mengsels. In beide gevallen wordt verondersteld dat de ene verbinding de biologische activiteit van de andere niet beïnvloedt (bij antagonisme en potentiëring is dat wel het geval).

## 2. Resultaten experimenteel onderzoek

### 2.1 Mengsels van niet-gewasbeschermingsmiddelen

Könemann (1981) heeft aangetoond dat de toxiciteit van mengsels (van 3 tot 50 stoffen met een verondersteld narcotische werking, de 'minimum toxiciteit') goed kan worden beschreven met het concentratie-additiemodel. De toxiciteit van deze mengsels kon worden voorspeld door sommering van de fracties van de  $LC_{50}$  van de afzonderlijke stoffen in het mengsel.

Oftewel:  $M = \sum C_i / LC_{50}$ . M wordt uitgedrukt in toxic units (TU). Hij nam waar dat bij een M-waarde van 0,9 tot 2,5 toxic unit (geometrisch gemiddelde 1,3 TU) in sub-acute toxiciteitstesten (14 d) 50% sterfte optrad bij vissen blootgesteld aan mengsels van stoffen.

Hermens et al. (1984a) toonden voor stoffen met een verondersteld narcotische werking aan dat er ook bij subletale effecten een combinatiewerking optreedt. De M-waarden voor immobilisatie van *Daphnia magna* (48 uur) bedroegen 1,0 tot 1,2 TU (mingsels van 10 tot 50 stoffen).

In mengsels van 5, 10 en 25 stoffen trad reproductieremming op bij M-waarden van 1,5 tot 2,0 TU (testduur ca 16 d). Het lijkt er op dat de mate van combinatiewerking iets kleiner is dan in het geval van het toxicologisch eindpunt sterfte: in dezelfde mengsels werd bij M-waarden van 0,9 tot 1,5 TU 50% sterfte waargenomen.

Ook uit later onderzoek met organische microverontreinigingen (exclusief bovenvermelde studies) en metalen (ref. Hendriks, 1995) blijkt dat bij waterdieren 50% effect veelal optreedt bij M-waarden tussen 0,5 tot 2 TU (toxicologisch eindpunt niet gespecificeerd).

## **2.2 Mengsels van gewasbeschermingsmiddelen én niet-gewasbeschermingsmiddelen**

In experimenten met mengsels van 8 stoffen met uiteenlopende werkingsmechanismen toonden Hermens en Leeuwangh (1982) aan dat 50% sterfte bij *Poecilia reticulata* (gup) optrad bij M-waarden tussen 1,1 en 1,7 TU. In een mengsel van 24 stoffen bedroeg de M-waarde 2,3 TU (Tabel 5). In experimenten met *D. magna* met mengsels van 14 stoffen, waarvan 6 actieve stoffen, met uiteenlopende werkingsmechanismen toonden Hermens et al. (1984b) aan dat 50% sterfte optrad bij een M-waarde van 1,2 TU (Tabel 5). In een andere test bleek 50% reproductieremming op te treden bij M=2,6 TU (Tabel 7).

In een intern rapport van het RITOX (van Lokven et al., 1993?) worden toxiciteitsexperimenten beschreven met mengsels van 5, 6 en 10 stoffen, waarvan 3 of 4 actieve stoffen. Gekeken werd naar acute vissterfte (*P. reticulata*, *Brachydanio rerio*), immobilisatie van de watervlo (*D. magna*) en naar sub-acute sterfte in de Early Life Stage (ELS)-studie met vis. Acute vissterfte trad op bij M-waarden van 1,7 tot 2,5 TU. Immobilisatie bij *D. magna* bij M-waarden van 0,9 en 4,0 TU. De M-waarde in de ELS studie (*B. rerio*) bedroeg 5,5 TU.

## **2.3 Binaire mengsels van gewasbeschermingsmiddelen**

Deneer (2000) geeft een overzicht van de resultaten van onderzoek aan mengsels van actieve stoffen, uitgevoerd tussen 1972 en 1998. Dit betreft 26 studies, waarin voor vissen, kreeftachtigen, insecten, schelpdieren en algen de toxiciteit werd onderzocht van 202 mengsels. Vrijwel alle studies betroffen mengsels van twee actieve stoffen. Doel van zijn studie was na te gaan in hoeverre de resultaten van de overwegend acute toxiciteitsexperimenten te beschrijven zijn met het concept concentratie-additie (CA; de stoffen in het mengsel hebben eenzelfde werkingsmechanisme en beïnvloeden de activiteit van elkaar niet). Als criterium werd gehanteerd dat er 50% effect (veelal sterfte) optrad bij blootstelling tussen 0,5 en 2,0 TU. Hoewel in theorie CA optreedt bij blootstelling aan 1,0 TU, werd het criterium verruimd om rekening te houden met de bekende experimentele variatie in de meetresultaten (een factor plus of min 2). Deneer (2000) stelt vast dat bij meer dan 90% van de 202 mengsels concentratie-additie de waargenomen toxiciteit beschreef binnen genoemde factor 2 (dus bij een M-waarde tussen 0,5 en 2 TU).

Indien echter de hypothese was getest dat de stoffen in de binaire mengsels een verschillende werking hebben (partiële additie, PA), dan was de conclusie geweest dat ook partiële additie de waargenomen toxiciteit goed beschrijft. Theoretisch treedt bij partiële additie 50% sterfte op bij een M-waarde tussen 1,0 en 2,0 TU (de exacte waarde is te berekenen indien de dosis-respons relaties van de afzonderlijke actieve stoffen nauwkeurig bekend zijn). Uitgaande van de experimentele reproduceerbaarheid, beschrijft partiële additie de waargenomen effecten even goed als concentratie-additie dat doet.

### 3. Concentratie-additie of partiële additie?

#### 3.1 Acute toxiciteit

De vraag of de acute toxiciteit van binaire mengsels het resultaat is van concentratie-additie of partiële additie is niet te beantwoorden omdat de experimenteel gemeten M-waarde meestal tussen 0,5 en 2,0 TU ligt.

Anders wordt dat indien het mengsels betreft van 3 of meer actieve stoffen. De M-waarde voor CA blijft, theoretisch, 1,0. De M-waarde voor PA ligt tussen 1,0 en n (n=aantal middelen in het mengsel). In Tabel 5 zijn de gemeten M-waarden in (sub-)acute toxiciteitstesten met mengsels weergegeven. De resultaten zijn moeilijk te interpreteren omdat het, met uitzondering van de binaire mengsels, gaat om onderzoek aan mengsels waarin gelijktijdig ook niet-gewasbeschermingsmiddelen aanwezig waren.

Tabel 5. M-waarden (in TU) in (sub-)acute toxiciteitstesten met mengsels gewasbeschermingsmiddelen. Toxicologisch eindpunt: mortaliteit.

taxon / bron	M (in TU)	testduur	opmerking
<b>vis</b>			
Deneer (2000)	0,7	48 tot 96 u	geometrisch gemiddelde; binaire mengsels; 12 testen
Hermens en Leeuwangh (1982)	1,3	14 d	geometrisch gemiddelde; 3 testen; 3 actieve stoffen in mengsel 8 stoffen
Hermens en Leeuwangh (1982)	1,3	14 d	4 actieve stoffen in mengsel 8 stoffen
Hermens en Leeuwangh (1982)	1,7	14 d	6 actieve stoffen in mengsel 8 stoffen
Hermens en Leeuwangh (1982)	2,3	14 d	11 actieve stoffen in mengsel 24 stoffen
van Lokven et al. (1993?)	1,7	96 u	3 actieve stoffen in mengsel 6 stoffen
van Lokven et al. (1993?)	2,0	96 u	4 actieve stoffen in mengsel 10 stoffen
van Lokven et al. (1993?)	2,5	96 u	4 actieve stoffen in mengsel 5 stoffen
van Lokven et al. (1993?)	5,5	14 d	ELS studie; 4 actieve stoffen in mengsel 5 stoffen
<b>kreeftachtigen</b>			
Deneer (2000)	1,1	48 u tot 28 d	geometrisch gemiddelde; binaire mengsels; 10 testen
Hermens et al. (1984b)	1,2	48 u	6 actieve stoffen in mengsel 14 stoffen
<b>insecten</b>			
Deneer (2000)	0,7	96 u	geometrisch gemiddelde; binaire mengsels; 8 testen
Deneer (2000)	0,8	96 u	gemiddelde; mengsel 3 actieve stoffen; 2 testen

De M-waarde voor de sub-acute toxiciteit in de ELS-studie met vis bedraagt 5,5 TU. Hier lijkt sprake van non-additie omdat het mengsel uit 5 stoffen bestond. Bij de verdere beschouwing wordt deze studie buiten beschouwing gelaten.

Het geometrisch gemiddelde van alle afzonderlijke meetwaarden voor de vis bedraagt 0,9 TU. De geometrisch gemiddelden van alle afzonderlijke meetwaarden voor de kreeftachtigen en insecten bedragen 1,1 respectievelijk 0,7. In de datasets valt op dat met name de data voor de kreeftachtigen weinig variatie vertonen.

*Conclusie: bij de berekening van (sub-)acute toxiciteit van mengsels, met mortaliteit als toxicologisch eindpunt, kan worden uitgegaan van het principe van concentratie-additie.*

Tabel 6. M-waarden (in TU) in acute toxiciteitstesten met mengsels gewasbeschermingsmiddelen. Toxicologisch eindpunt: immobiliteit.

taxon / bron	M (in TU)	testduur	opmerking
<b>kreftachtigen</b>			
van Lokven et al., (1993?)	0,9	48 u	3 actieve stoffen in mengsel 6 stoffen
van Lokven et al., (1993?)	4,0	48 u	4 actieve stoffen in mengsel 10 stoffen

De resultaten van de twee acute toxiciteitstesten met immobiliteit als toxicologisch eindpunt zijn sterk verschillend. Mede op basis van de waarnemingen met niet-gewasbeschermingsmiddelen (zie hiervoor) wordt verondersteld dat de combinatiewerking bij immobilisatie berust op concentratie-additie.

*Conclusie: bij de berekening van de acute toxiciteit van mengsels, bij kreftachtigen met als toxicologisch eindpunt immobilisatie kan worden uitgegaan van het principe van concentratie-additie.*

### 3.2 (Semi)chronische toxiciteit

Er is weinig bekend over de (semi)chronische toxiciteit van mengsels van actieve stoffen. Gegevens over *algen* betreffen uitsluitend binaire mengsels (Tabel 7). Het geometrisch gemiddelde van alle M-waarden voor algen bedraagt 1,0 TU.

*Conclusie: op grond van onvoldoende gegevens wordt vooralsnog uitgegaan van concentratie-additie.*

Tabel 7. M-waarden (in TU) in (semi)chronische toxiciteitstesten met mengsels gewasbeschermingsmiddelen. Toxicologisch eindpunt: groeiremming (alg) of reproductieremming (kreftachtigen).

taxon / bron	M (in TU)	testduur	opmerking
<b>algen</b>			
Faust et al., 1991	1,0	24 u	groeiremming; geometrisch gemiddelde; 29 binaire mengsels
Faust et al., 1994	1,0	24 u	geometrisch gemiddelde; 38 binaire mengsels
<b>kreftachtigen</b>			
Hermens et al., 1984b	2,6		6 actieve stoffen in mengsel 14 stoffen; EC50 (ca 16 d.); remming reproductie

Van *kreftachtigen* is slechts één gegeven bekend over reproductieremming door een mengsel van 14 stoffen, waaronder 6 actieve stoffen. De mate van combinatietoxiciteit in dit reproductie-experiment is minder dan die in een experiment met sterfte als parameter (vergelijk  $M_{\text{reproductie}}=2,6$  TU (Tabel 7);  $M_{\text{mortaliteit}}=1,2$  TU (Tabel 5)).

Hermens et al. (1984a) toonden voor mengsels van 5, 10 en 25 niet-reactieve, niet-gewasbeschermingsmiddelen aan dat de reproductieremming bij *kreftachtigen* in geringe mate minder is dan concentratie-additief ( $M_{\text{geom. gemiddelde}}=1,8$ ). Hermens et al (1984b) veronderstellen dat de bijdrage van afzonderlijke stoffen bij aangrijpen op een specifieke receptor kleiner is dan bij aangrijpen op receptoren die acute sterfte veroorzaken. Conclusie: bij reproductieremming is er sprake van partiële additie. De mate van additie is in geringe mate minder dan concentratie-additief.

*Uitgangspunt bij de berekening van de (semi-) chronische toxiciteit van mengsels bij algen en kreftachtigen: uitgaan van concentratie-additie.*

Dit voorstel wordt ingegeven vanuit het voorzorgprincipe én het gegeven dat de waargenomen mengseltoxiciteit weinig afwijkt van concentratie-additief.

Over de mengseltoxiciteit bij aquatische (in)vertebraten voor andere dan bovenvermelde subletale toxicologische eindpunten is niets bekend. *Gegeven het bovenstaande wordt bij de beoordeling van (semi-)chronische mengseltoxiciteit voor waterorganismen uitgegaan van concentratie-additie.*

### 3.3 Samenvattend

Hoewel de effecten van mengsels van actieve stoffen in gewasbeschermings-middelen maar op zeer beperkte schaal en niet voor alle relevante soorten en toxicologische eindpunten zijn onderzocht, wordt verwacht dat actieve stoffen in een combinatiemiddel gezamenlijk bijdragen aan de giftigheid van dat middel.

De mate waarin de actieve stoffen bijdragen is slecht bekend. De beschikbare gegevens geven aan dat ook bij partiële additie de mate van combinatietoxiciteit niet sterk afwijkt van concentratie-additie. Op grond van deze twee overwegingen wordt bij de beoordeling van de toxiciteitgegevens van combinatiemiddelen uitgegaan van concentratie-additie.

### 4. Literatuur

- Deneer JW. 2000 Combined action of pesticides towards aquatic organisms. A review of available literature from 1972-1998. Alterra, Green World Research, Wageningen. Alterra-rapport 004.
- Faust M, Altenburger R, Boedeker W, Grimme LH. 1991. Additive effects of herbicide combinations on aquatic non-target organisms. *Sci. Tot. Environ. Supplement* 1993, 941-952.
- Faust M, Altenburger R, Boedeker W, Grimme LH. 1991. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 134-141.
- HARAP. 1999. Guidance document on Higher-tier Aquatic Risk Assessment for Pesticides. Ed. Campbell, P.J., Arnold, D.J.S., Brock, T.C.M., Grandy, N.J., Heger, W., Heimbach, F., Maund, S.J. and Strelake, M. SETAC-Europe/OECD/EC workshop 1998.
- Hendriks J. 1995. Concentrations of microcontaminants and response of organisms in laboratory experiments and Rhine delta field surveys. Thesis, Utrecht. pp. 237.
- Hermens JLM, Leeuwangh P. 1982. Joint toxicity of mixtures of 8 and 23 chemicals to the guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 6: 302-310.
- Hermens JLM, Canton H, Wegman R. 1984a. Quantitative structure-activity relationships and toxicity studies of mixtures of chemicals with anaesthetic potency: acute lethal and sublethal toxicity to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 5: 143-154.
- Hermens JLM, Canton H, Steyger N, Wegman R. 1984b. Joint effects of a mixture of 14 chemicals on mortality and inhibition of reproduction of *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 5: 315-322.
- Könemann W.H. 1981. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: a proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology* 19: 229-238.
- Van Lokven MEM, Deneer JW, Hermens JLM. 199?. Combinatietoxiciteit voor aquatische organismen van mengsels van microverontreinigingen met niet-identieke werkingsmechanismen. Intern rapport RITOX, Utrecht.