

## **Abschlussbericht**

Projekttitle: **Gas-Partikel-Mischungen am Arbeitsplatz: Entwicklung von neuartigen personengetragenen Probenahmesammlern und Untersuchung der unterschiedlichen Toxizität von Gasen und Partikeln**

Auftraggeber: **Die Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung e. V.  
Alte Heerstraße 111,  
53757 St. Augustin**

Projekt-Nr.: **FP425**

Autoren: **Narges Rastak  
Stephanie Binder  
George Ferron  
Erwin Karg  
Martin Sklorz  
Ralf Zimmermann**

Laufzeit: **01.02.2019 – 31.08.2022**

München, 24.11.2022

**Auftragnehmer:**

Helmholtz Zentrum München GmbH  
Kooperationsgruppe „Comprehensive Molecular Analytics“ (CMA)  
Prof. Dr. Ralf Zimmermann  
Gmunderstraße 37  
81379 München

**Kontakt:**

Tel.: 089-3187-4544

Fax: 089-3187-3371

E-Mail: [ralf.zimmermann@helmholtz-muenchen.de](mailto:ralf.zimmermann@helmholtz-muenchen.de)

# Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch.....	5
Kurzfassung Englisch.....	7
1. Problemstellung .....	9
2. Forschungsziel.....	9
3. Methodik.....	10
3.1 Aerosolgeneratoren .....	10
3.1.1 Modifikation des TOPAS-Aerosolgenerators für die Erzeugung großer Partikel.....	10
3.1.2 Erzeugung von Rußpartikeln mittels Combustion Aerosol Standard (CAST) Partikelgenerator .....	11
3.2 Gas-Partikel Trennung .....	11
3.2.1 Multi-Channel Silicone Rubber Traps .....	12
3.2.2 Silikon-Denuder .....	12
3.2.3 "Neue" Aktivkohledenuder .....	13
3.3 Das neue Zellenexpositionssystem.....	15
3.3.1 Zelleexpositionen mit Reinluft .....	19
3.3.2 Zelleexpositionen mit Dibutylphthalat (DBP).....	20
3.4 Die Modelle und Berechnungen.....	20
3.4.1 Verdunstungsverhalten von großen Partikeln (Experiment vs. Modell) .....	20
3.4.2. Gas-Partikel-Verteilung von Aerosolen bei zwei unterschiedlichen Stoffen .....	22
3.4.3 Verdunstung und Lebensdauer von Dibutylphthalat-Partikeln .....	23
3.4.4 Deposition von DBP-Partikeln in den Alveolen der menschlichen Lunge.....	23
3.4.5 Modellierung der Zelleexposition und theoretische Ansätze .....	24
3.4.6 Berechnete und gemessene Deposition von DBP-Partikeln .....	26
4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens .....	27
4.1 Aerosolgeneratoren .....	27
4.1.1 Modifikation des TOPAS-Aerosolgenerators für die Erzeugung großer Partikel.....	27
4.1.2 Erzeugung von Rußpartikeln mittels Combustion Aerosol Standard (CAST) Partikelgenerator .....	28
4.2 Gas-Partikel Trennung .....	29
4.2.1 Multi-Channel Silicone Rubber Traps .....	29
4.2.2 Silikon-Denuder .....	29
4.2.3 "Neue" Aktivkohledenuder .....	30
4.3 Das neue Zellenexpositionssystem.....	32
4.3.1 Zelleexpositionen mit Reinluft .....	32
4.3.2 Zelleexpositionen mit Dibutylphthalat (DBP).....	33
4.4 Die Modelle und Berechnungen.....	34
4.4.1 Verdunstungsverhalten von großen Partikeln (Experiment vs. Modell) .....	34

4.4.2 Gas-Partikel-Verteilung von Aerosolen aus zwei unterschiedlichen Stoffen .....	35
4.4.3 Verdunstung und Lebensdauer von Dibutylphthalat-Partikeln .....	37
4.4.4 Deposition von DBP-Partikeln in den Alveolen der menschlichen Lunge.....	38
4.4.5 Modellierung der Zellexposition und theoretische Ansätze .....	40
4.4.6 Berechnete und gemessene Deposition von DBP-Partikeln .....	42
5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen.....	43
6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen .....	43
7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan .....	46
8. Literatur .....	48

## Kurzfassung deutsch

### Ziele

Halbflüchtige organische Verbindungen (semi-volatile organic compounds, SVOC) belasten häufig die Atemluft in Innenräumen und speziell am Arbeitsplatz (Cao, 2022). Ziel dieses Projektes war, das Verhalten dieser Aerosole und ihre toxikologische Wirkung auf Zellsysteme zu untersuchen. SVOCs können gleichzeitig in Gas- und Partikelphase vorliegen. Lufttemperatur, Luftdruck und Dampfdruck bestimmen – zusammen mit anderen Faktoren wie chemischer Zusammensetzung und Partikelgröße die Aufteilung der luftgetragenen SVOC-Masse in Gas- und Partikelphase (GPP, Gas-Particle-Partitioning). GPP führt auch zu Problemen bei der Probenahme am Arbeitsplatz, da sich die Luft- und Partialdruckverhältnisse während der Probenahme rasch ändern können. Auch für die toxikologische Bewertung von SVOCs spielt GPP eine entscheidende Rolle, da sich die Exposition mit der Gasphase erheblich von der Exposition mit der Partikelphase unterscheidet.

Im vorliegenden Projekt wurde versucht, die üblicherweise verwendeten und am Körper getragenen Probenahmegeräte zu verbessern. Ein weiteres Ziel war, die gesundheitlichen Auswirkungen von SVOCs mit Hilfe eines geeigneten „*in vitro Air-Liquid Interface*“ (ALI) Expositionssystems für humane Zellen in Gas- und Partikelphase getrennt zu untersuchen.

### Methoden

Alkane verschiedener Kettenlänge und der zyklische Kohlenwasserstoff Dibutylphthalat (DBP) wurden als Modellsubstanzen verwendet. Ein Kondensations-Aerosolgenerator (SLG 270, Topas GmbH) erzeugte aus verdampfter Flüssigkeit die Partikel für die Experimente.

Ein neuer Gas-Adsorber auf Holzkohle-Basis („Denuder“) wurde charakterisiert und auf seine Gasadsorptionskapazität sowie Partikeltransmissionseffizienz getestet; der in den vorangegangenen Projekten im „*personal sampler*“ GGP (Gesamtstaub-Gas-Probenahmesystem, DGUV-IFA) verwendete Denudertyp ist auf dem Markt nicht mehr erhältlich.

Um die toxikologische Wirkung von SVOCs zu untersuchen, wurde ein ALI-Zellexpositionssystem aufgebaut und getestet. Ein Kühlschrank wurde modifiziert, mit Wasserbad und Belüftungssystem zur Klein-Klimakammer umgebaut. Diese Klein-Klimakammer ermöglicht die Zellexposition exakt und langzeitstabil bei Körpertemperatur (37°C). Einem Expositionsmodul der Firma VITROCELL® ist ein neues Befeuchtungssystem vorgeschaltet: Es besteht aus einem Dialysemembran-Schlauch für den Aerosolfluss in einem wasserbespülten Glasrohr und ermöglicht, das Aerosol auf mehr als 90% zu befeuchten. Zusätzlich ist das Vitrocell-Modul an ein Wasserbad angeschlossen, welches die Zellen auf  $37\pm 0.5^\circ\text{C}$  hält. Aus Gründen der Laborsicherheit sind alle Ausgänge der Klein-Klimakammer mit Filtern und Kohlenstoffabscheidern ausgestattet und mit einem Abzug verbunden. Dadurch ist – im Gegensatz zum originalen VITROCELL® ALI-System – ein ungefährlicher Betrieb auch mit toxischen Aerosol-Substanzen gesichert. Das Aerosol-Leitsystem ist zudem einfacher und mit kurzen Schlauchverbindungen aufgebaut, um den Transportverlust von Partikeln während der Exposition zu minimieren. Dadurch kann auch die deponierte Dosis anhand eines eigens entwickelten Rechenmodells präziser abgeschätzt werden. Die Modell-Ergebnisse wurden mit Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Messungen (LC-MS) verglichen.

Um im Aerosolstrom die Gas- von der Partikelphase zu trennen, wurden sowohl Denuder als auch Filter eingesetzt. Die neuen Holzkohle-Denuder wurden in Größe und Form in die Zuluftführung des Expositionsmoduls eingepasst und so nah wie möglich an den Zellen platziert (d. h. innerhalb der „Trompete“ direkt über den Zellen). Die Gasphase wird vom Denuder adsorbiert, sodass nur noch mit der Partikelphase exponiert wird. In einer anderen Expositions-Konfiguration wurde an gleicher Stelle ein Glasfaserfilter eingesetzt, um die Partikelphase aufzufangen und nur mit Gasphase zu exponieren. Insgesamt wurden fünf verschiedene Expositions-Konfigurationen etabliert: Reinluft, Partikelfilter, Gasphasendenuder, Filter + Denuder und weder Filter noch Denuder. Dies entsprach jeweils dem Protokoll: Reinluft, Gasphase alleine, Partikelphase alleine, Residual (kein Aerosol) und gesamtes Aerosol. Für alle

Zellexperimente wurde Dibutylphthalat (DBP, CAS 84-74-2, C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>) als repräsentative SVOC-Verbindung verwendet.

## Ergebnisse

Der neue Holzkohle-Denuder zeigt eine hohe Gasadsorptionskapazität auch für flüchtigere Verbindungen wie Toluol. Der Durchbruch von Toluol war sehr gering (weniger als 2 % selbst nach 24 Stunden). Die Partikeltransmissionseffizienz wurde für kleine Partikel mit Ruß und für größere Partikel mit Hexadekan-Tröpfchen getestet. Diffusionsverluste reduzierten die Transmission für kleine Partikel (<100 nm) bei geringen Durchflussraten. Für große Partikel (>1 µm) spielt die Diffusion keine Rolle. Dennoch nahm die Transmissionseffizienz mit zunehmender Partikelgröße und steigender Flußrate ab. Impaktion von großen Partikeln an der Denuder-Stirnseite wird bei hohen Flußgeschwindigkeiten als Hauptgrund vermutet.

Reinluft-Experimente zur Zellviabilität zeigten, dass das neue Expositionssystem über die bisherigen 2- und 4-Stunden hinaus sogar für Expositionen bis zu 24-Stunden geeignet ist. Während die Ergebnisse der ersten Studie zeigten, dass DBP in arbeitsplatzrelevanten Konzentrationen DNA-Schäden und chromosomale Aberrationen in A549 Lungenzellen am ALI induziert, konnte mit Hilfe des neu entwickelten ALI-Expositionssystem ein Unterschied in der induzierten Genotoxizität von Gas- und Partikelphase ermittelt werden, wobei oxidative DNA-Schäden vornehmlich durch einen Partikel-induzierten Effekt entstanden.

Die berechnete deponierte Dosis für DBP-Partikel stimmte gut mit der gemessenen deponierten Dosis unter Verwendung des Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) – Systems überein.

Modellrechnungen für DBP-Tröpfchen von 1-10 µm Durchmesser zeigen eine „Lebensdauer“ zwischen 70 s und 1000 s. Dies ist lange genug, um Experimente mit Denudern (mit und ohne Umgebungsdampfdruck) verlässlich durchgeführt werden können. Modellrechnungen zur deponierten Dosis im menschlichen Atemtrakt zeigen, dass für die verwendeten Mikrometer-Partikel eine vergleichbare Dosis zwischen ALI-Experiment und menschlicher Lunge erzielt werden können. Somit können die ALI-Experimente als „gesundheitsrelevant“ eingestuft werden.

## Schlussfolgerungen

Bei den personen-getragenen GGP-Sammlern können die neuen Holzkohle-Denuder als Ersatz für die (nicht mehr lieferbaren) alten verwendet werden. Allerdings sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die neuen Holzkohle-Denuder mit verschiedenen chemischen Verbindungen und im praktischen Einsatz am Arbeitsplatz zu testen. Die Denuder eigneten sich auch gut für die Adsorption der Gasphase während der Zellexpositionsexperimente, da hier der Aerosolfluss sehr gering ist ( $\leq 100$  ml/min). Das neue Zellexpositionssystem ist für alle Modellaerosole (inklusive toxischer Stoffe), sowie für eine verlängerte Expositionsdauer (bis zu 24 Stunden) gut geeignet. Das vereinfachte Schlauchsystem ermöglicht eine genauere Dosisabschätzung als bei herkömmlichen Zellexpositionssystemen. Verschiedene System-Konfigurationen ermöglichen die getrennte Untersuchung mit SVOC Gas- und Partikelphase, was bei anderen Expositionssystemen schwierig zu bewerkstelligen ist. In dieser Studie wurde Dibutylphthalat (DBP) als Modellsubstanz verwendet. Weitere toxikologische Untersuchungen mit anderen flüchtigen Verbindungen werden empfohlen.

## Kurzfassung Englisch

### Objectives

Semi-volatile organic compounds (SVOCs) frequently pollute our breathing air indoors and especially at workplace (Cao, 2022). Aim of this project was to investigate their behavior and toxicological effects. SVOCs can exist in both gas and particulate phase simultaneously. The workplace environment (e.g., temperature and pressure) along with other factors (e.g., chemical composition, particle size and vapour pressure of the compounds) determine the gas-particle partitioning (GPP) behaviour of SVOCs. This complex behaviour also causes sampling problems at the workplace. The coexistence of gas and particle phase must be considered for a comprehensive toxicological evaluation as well.

In this project, we tried to improve the personal sampling tools commonly used at workplace. Another objective was to study the health effects of SVOCs in gas and particle phase separately using an appropriate in vitro Air-Liquid Interface (ALI) cell exposure system.

### Methods

The charcoal denuder used in the personal samplers ("Gesamtstaub-Gas-Probenahme-System" GGP) during the previous projects is not available in the market anymore. Therefore, a new charcoal denuder was characterized and tested for its gas adsorption capacity and particle transmission efficiency.

Dibutyl phthalate (DBP) was selected as a representative SVOC compound for cell exposures. Different types of particles (e.g. alkane and DBP) were produced using a condensation particle generator (SLG 270, Topas GmbH).

To investigate the toxicological effect of SVOCs, a new cell exposure system was built and tested in our laboratory. The new system was set up inside a refrigerator, modified to work as a climate chamber at 37°C by adding a water bath and a ventilation system. The original exposure module provided by VITROCELL® Company along with a new humidification system were installed inside to serve now as fully integrated exposure system. The humidification system consists of a water-filled glass tube with dialysis membrane inside to let the aerosol flow passes through. In this way, relative humidity can reach >90% in the aerosol flow. The Vitrocell module is attached to an extra water bath to stabilize the cells in the required temperature range of 37±0.5°C. For safety purposes, all the exits are attached to filters and carbon denuders and are guided to a fume hood. This new system is less complex and safer than the original VITROCELL® ALI system, especially for toxic aerosols. The aerosol guidance system is simplified with short tubes, resulting in less particle loss during the exposure. This also helps to estimate the deposited dose more accurately. A computer model was developed to estimate the deposited dose in a Vitrocell module. The results from the model were compared to measurements by a Liquid Chromatography–Mass Spectrometer (LC-MS) system.

To separate the gas from the particle phase in the exposure aerosol flow, denuders and filters were used. The new charcoal denuder was crafted by hand in size and shape to fit into the exposure module's aerosol inlet, as close as possible to the cell layer (i.e. inside the "trumpet" flow-shaper). The gas phase of the aerosol was adsorbed by the denuder and only the particle phase could pass through. In another system configuration, a glass-fibre filter was installed in place to collect the particle phase and pass the gas phase. We set up five different exposure configurations (clean air / filter / denuder / filter+denuder / no installation) which correspond to five experimental protocols (clean air / gas phase / particle phase / no aerosol / total aerosol), respectively.

### Results

The results show that the new charcoal denuder has a high gas adsorption capacity even for more-volatile compounds like Toluene. The breakthrough of Toluene was very low (less than 2 % even after 24 hours). The particle transmission efficiency of the new denuder was tested for small particles with soot and for larger particles with Hexadecane. Due to diffusion, the greatest loss occurred for small particles at low flow rates. For larger particles,

the transmission efficiency of particles decreased with increasing particle size and increasing flow rate. Impaction of large particles at the denuder-face at high flow rates might be the main reason.

The cell viability experiments with clean air in the new exposure system show that the system is suitable to host cells longer than the convenient 2 - 4 hours, and even up to 24 hours. This is technically not possible with previous cell exposure systems. The results of the first study showed that DBP infers DNA and chromosome damage in human lung A549 cells in occupationally relevant exposure concentrations, while the newly designed ALI exposure system was able to distinguish effects in gas and particle genotoxicity, in which oxidative DNA damage seemed to be related to a DBP particle-induced effect, while gas phase exposure led to genotoxic effect through a distinct mode of action. The calculated deposited dose for DBP particles was in a good agreement with the measured deposited dose using the Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS) system.

Model calculations for DBP droplets of 1-10  $\mu\text{m}$  diameter show a "life span" between 70 s and 1000 s. This span is long enough to perform experiments reliably with and without ambient vapor pressure.

Model calculations of the deposited dose in the human respiratory tract show, that the dose in ALI experiments can be adjusted to yield comparable results for the micrometer particles used. Consequently, our ALI experiments can be classified as "health relevant".

## Conclusions

In the personal samplers the new charcoal denuder can be considered as a replacement for the old one (which is not on the market anymore). Further research is needed to test the new charcoal denuder with different chemical compounds and at the workplace. The charcoal denuder is also suitable for gas phase adsorption in cell exposure experiments, due to the very low aerosol flow in the exposure system ( $\leq 100$  ml/min).

The newly developed cell exposure- / chamber-system is safe, even for experiments with toxic substances, and is tested to host cells longer than the conventional 2-4 hours, and up to 24 hours. The simplified tubing system results in a reduced particle loss and in a more accurate dose estimation, which is one of the main issues in cell exposure systems. In this study, the system was used for dibutyl phthalate (DBP). Further investigation on toxicological cell response with compounds of higher volatility than DBP is recommended.



## 1. Problemstellung

Die Probenahme halbflüchtiger Verbindungen in der Atemluft am Arbeitsplatz ist eine große Herausforderung, da diese Verbindungen gleichzeitig in Gas- und Partikelphase vorliegen können. Abhängig von den Umgebungsbedingungen sind halbflüchtige Verbindungen starken und schnellen Veränderungen unterworfen, welche vor, während, aber auch nach der Probenahme stattfinden können. Um präzise Probenahmeverfahren und -instrumente zu entwickeln, ist es wichtig, das Verhalten dieser Verbindungen zu verstehen. Zusätzlich zur Messung der Gesamtaerosolkonzentration muss zwischen der Gas- und der Partikelphase unterschieden und ein mögliches Abdunsten vom Filterkuchen registriert werden. Die Quantifizierung sowohl der Gas- als auch der Partikelphase ist wichtig, wenn die Toxizität einer Substanz bewertet und wenn Grenzwerte oder Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK-Werte) ermittelt werden sollen.

Halbflüchtige organische Verbindungen (SVOCs) werden an den unterschiedlichsten Arbeitsplätzen emittiert, häufig aber an Arbeitsplätzen mit industriellen Fertigungsprozessen unter hohem Energieeinsatz (Lillienberg et al., 2008). Dabei können die SVOCs – abhängig von den Umgebungsbedingungen – als Dampfphase, als Partikelphase oder als Mischung beider in die Atemwege gelangen. Das Einatmen von SVOC-Aerosol führt beispielsweise zur Reizung der Atemwege, zu Berufskrankheiten wie obstruktive Lungenerkrankung oder sogar zu Krebs (Calvert et al., 1998; Cohen und White, 2006; Fischer et al., 2003; Gauthier, 2003; Robins et al., 1997).

Biologische Analysen in Form von *in-vitro*-Experimenten an Zellen des Lungengewebes, tragen zum besseren Verständnis der primären zellulären Auswirkungen bei und helfen bei der Begründung von Grenzwerten für die Exposition am Arbeitsplatz. Obwohl die Toxizität einiger halbflüchtiger Verbindungen bekannt ist, ist die Rolle der Partikelphase im Vergleich zur Gasphase kaum untersucht. Es ist aber von entscheidender Bedeutung, zu verstehen, ob die gleiche Konzentration der Gas- und der Partikelphase auch die gleiche schädliche Wirkung hat. In der derzeit verfügbaren Literatur findet sich kein Hinweis, welcher physikalische Zustand einer SVOC die schwerwiegenderen toxikologischen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit hat.

## 2. Forschungsziel

Das Hauptziel dieses Projekts ist die Untersuchung des Verhaltens sowie der toxikologischen Wirkung von halbflüchtigen organischen Verbindungen, wenn sie in Gasphase, Partikelphase oder beiden Phasen vorliegen.

Das Projekt umfasst mehrere Arbeitspakete von der Probenahme am Arbeitsplatz bis hin zur *in-vitro*-Exposition menschlicher Lungenzellen in Experiment und Theorie. Je nach Arbeitspaket werden Aerosole unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung hergestellt. Dafür stehen verschiedene Aerosolgeneratoren zur Verfügung. Eines der Ziele ist, einen Aerosolgenerator so zu modifizieren, dass speziell große Partikel ( $> 1 \mu\text{m}$ ) erzeugt werden können. Partikel solcher Größe entstehen am Arbeitsplatz bei mechanischer Materialbearbeitung und Flüssigkeitskühlung. Im Labor sind solche Mikron-Partikel gut geeignet, die Lebensdauer und das Verdunstungsverhalten von SVOC-Partikeln zu studieren.

Ein weiteres Ziel des Projekts ist, personengetragene Sammler hinsichtlich ihrer SVOC-Probenahmefähigkeit zu verbessern. Die Personenprobenehmer sind mit Filter und Gasphasen-Adsorber (Denuder) ausgestattet. In diesem Projekt wurde ein neuer Holzkohle-Denuder charakterisiert und als Ersatz für den bisher verwendeten Denuder eingeführt, welcher nicht mehr im Handel erhältlich ist.

Für die Untersuchung der toxischen Wirkung von SVOCs auf Zellen des menschlichen Atemtraktes wurde ein neues Zellexpositionssystem konstruiert, das vor allem sicher im Umgang mit toxischen Stoffen ist. Das neue System ist auf kurze Schlauchverbindungen optimiert, was zu weniger Abfall bei Substanzwechsel, weniger Undichtigkeiten, weniger Partikeltransport-Verlusten und zu präziseren Dosisabschätzungen führt. Der neue Holzkohle-Denuder, sowie angepasste Glasfaserfilter wurden ins System integriert und ermöglichen erstmals, die toxische Wirkung der Gas- und Partikelphase getrennt zu untersuchen.

Der Schlüsselparameter für das Verständnis der toxikologischen Wirkung ist die – während der Zellexposition deponierte – Dosis. Da Dosismessungen sehr aufwändig sind, war die Entwicklung eines Computermodells eines der Projektziele. Es berechnet die auf der Zelloberfläche innerhalb des neuen Zellexpositionssystems deponierte Dosis (*TD, tissue deposited dose*) in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern wie der Partikelgröße und –dichte, der Systemgeometrie und den inneren Umgebungsbedingungen (Druck und Temperatur). Im letzten Schritt wurde das Modell durch Messungen während der Zellexposition überprüft. Zusätzlich wurde die Relevanz der Zellexposition durch die vergleichende Dosis-Modellierung für die menschliche Lunge beleuchtet.

### 3. Methodik

In diesem Kapitel werden die Forschungsarbeiten dargestellt, die seit Projektbeginn erfolgt sind.

#### 3.1 Aerosolgeneratoren

##### 3.1.1 Modifikation des TOPAS-Aerosolgenerators für die Erzeugung großer Partikel

Um große Partikel zu erzeugen, haben wir den ursprünglichen TOPAS-Aerosolgenerator (SLG 270, Topas GmbH, Dresden) modifiziert, der bereits in früheren DGUV-Projekten eingesetzt wurde. Eine neue Salzkernproduktionslinie ist nun außerhalb des Generatorgehäuses installiert. Diese Produktionslinie ist mit zusätzlichen Nadelventilen und einem Filter ausgestattet. Daher werden die alten Durchflussmesser im ursprünglichen Generator nicht mehr verwendet. Diese neue Modifikation ermöglicht es, die Salzkernkonzentration genauer zu steuern. Der Nacherhitzer und der Sättiger blieben unangetastet. In den Sättigungsglasbehälter (Kessel) wird unsere Zielverbindung eingefüllt. Die Temperatur des Sättigers bestimmt die Menge des Dampfes, der in das System eintritt und an den Salzkernen kondensiert. Die Menge des Dampfes (gesteuert durch die Sättigungstemperatur) bestimmt zusammen mit der Salzkernkonzentration die Größe und Konzentration der erzeugten Partikel. Dieser Generator kann Partikel im Größenbereich von 1-12  $\mu\text{m}$  erzeugen. Um die Toxizität von DBP zu untersuchen, ist eine Reihe von Zellexpositionen mit dieser Substanz geplant. Daher wurde die Herstellung von DBP-Partikeln im Größenbereich von 1-2  $\mu\text{m}$  in verschiedenen Konzentrationen mit dem TOPAS-Aerosolgenerator getestet. Die neue Modifikation ist in (Abbildung 1) dargestellt.

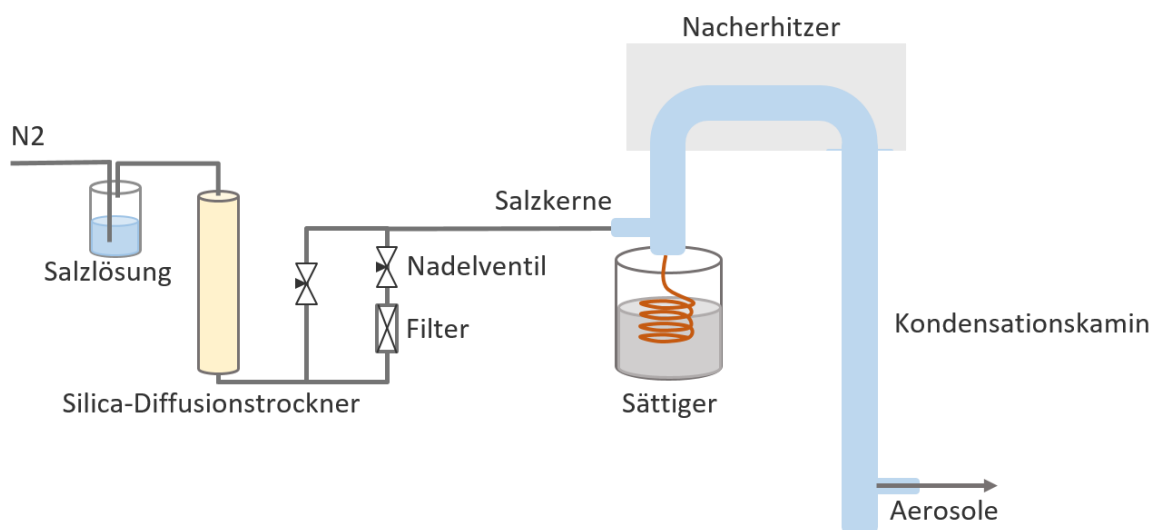


Abbildung 1: Der Aufbau des neuen modifizierten TOPAS-Aerosolgenerators zur Erzeugung großer Partikel. Eine neue Salzkernproduktionslinie ist außerhalb des Generatorkörpers installiert.

### 3.1.2 Erzeugung von Rußpartikeln mittels Combustion Aerosol Standard (CAST) Partikelgenerator

Zur Erzeugung von Rußpartikeln wurde der Combustion Aerosol Standard-Generator (Mini-CAST, Typ 5200, Schweiz) eingesetzt und optimiert. Gezieltes *quenching* einer Propanflamme mit Stickstoff führt hierbei zur Partikelbildung durch Kondensation kurzkettiger Radikale zu hochmolekularen aromatischen Strukturen. Durch Optimierung des Brennstoff-/Luftverhältnisses und dem Zeitpunkt des *quenchings* kann sowohl die chemische Zusammensetzung (im Wesentlichen charakterisiert durch das EC/OC-Verhältnis) als auch die Größenverteilung optimiert werden. Die primäre Partikelkonzentration ist extrem hoch und wird noch intern im CAST mit gereinigter Druckluft verdünnt – direkt im Anschluss erfolgen weitere Verdünnungsschritte, um a) eine Koagulation der Partikel zu vermeiden und b) arbeitsplatzrelevante Konzentration im Bereich unter  $1\text{mg}/\text{m}^3$  zu erhalten. Über eine temperierte Diffusionsquelle können anschließend gezielt organische gasförmige Verbindungen zugegeben werden. Die letzte Verdünnungsstufe erfolgt mit befeuchteter, gereinigter Druckluft, um Versuche bei 0 bis 90% relativer Luftfeuchte durchführen zu können (Abbildung 2).

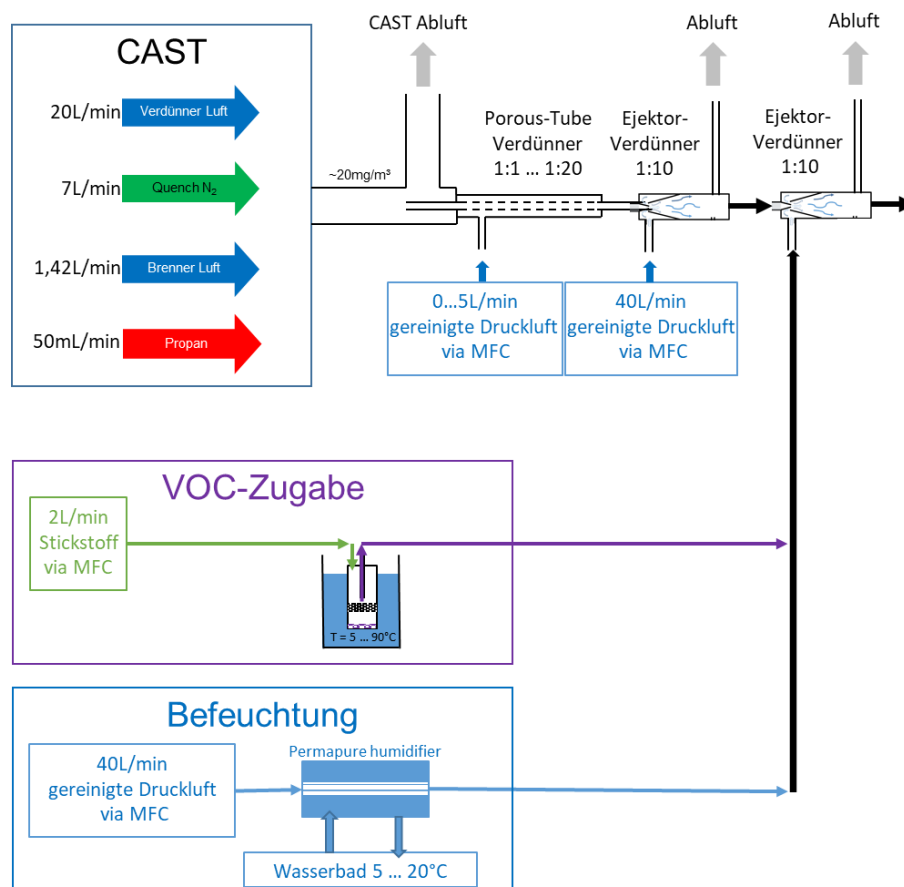


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema zur Erzeugung von Rußpartikeln

### 3.2 Gas-Partikel Trennung

Wird ein Denuder in einem personengetragenen Sammler, wie beispielsweise dem GGP (Gesamtstaub-Gas-Probenahme) oder GGP-Mini vor dem sich darin befindenden Filter angebracht, so kann die Gasphase von der Partikelphase eines Aerosols abgetrennt werden. Während die Gasphase eines durch den Denuder strömenden Aerosols je nach Denudermaterial ab- oder adsorbiert wird, strömen Partikel im Idealfall ungehindert durch den Denuder und werden auf dem Filter abgeschieden. Verdunstet Partikelmasse vom Filter („Blow-Off-Effekte“), kann diese wiederum mittels des hinter dem Filter angebrachten Adsorbiermaterials aufgenommen werden. Somit können mittels Denuder modifizierte GGP- oder GGP-Mini-Sammler Dämpfe und Partikel eines SVOC-Aerosols

gleichzeitig aber getrennt gesammelt werden. Weiterhin können mittels Denuder „Blow-On-Effekte“ vermieden werden, da Dämpfe durch den Einsatz von Denudern nicht auf dem Filter gesammelten Partikelmasse durch Kondensation abgeschieden können.

In diesem Projekt wurden Studien mit „Multi-Channel Silicone Rubber Trap“-Denudern sowie Silikon-Denudern durchgeführt. Im Vorgängerprojekt FP 371 wurden die „Multi-Channel Silicone Rubber Traps“ bereits charakterisiert und mit einem GGP-Mini-Sammler kombiniert. Die Denuder-GGP-Mini-Sammler (D-GGP-Mini) wurden ebenfalls im Vorgängerprojekt FP 371 untersucht. Die Silikon-Denuder dagegen wurden im Laufe des Projektes FP 425 angefertigt und eignen sich aufgrund ihrer Maße als Gas-Partikel-Trennungseinheit in einem GGP-Sammler.

### 3.2.1 Multi-Channel Silicone Rubber Traps

„Multi-Channel Silicone Rubber Trap“-Denuder bestehen aus Thermodesorptionsröhrchen (Länge 89 mm, Innendurchmesser (I.D.) 4 mm) der Firma Sigma-Aldrich (USA). Im Inneren befinden sich 22 parallel eingebettete Silikonkautschukschläuche (Länge 55 mm, Innendurchmesser (I.D.) 0,3 mm, Außendurchmesser (A.D.) 0,6 mm) der Firma Sil-Tec, Technical Products, Inc., Georgia (USA). Diese wurden als Denuder-GGP-Mini-Sammler im Vorgängerprojekt in einer Platinmine in Südafrika eingesetzt, um die Gas- von den Partikelphasen unpolarer SVOC-Aerosole unter Tage abzutrennen. Da an den Probenahmeorten auch Stoffe mit niedrigeren Siedepunkten wie Naphthalin und Dodecan (Siedepunkte bei ca. 216-218 °C) vorgefunden werden konnten, sollte untersucht werden ab welchen Beladungszeiten es bei beiden gasförmigen Substanzen im Denuder zu Durchbrüchen kommt.

Für die Experimente wurde Verbrennungsaerosol aus B0-Diesel (ohne biogenen Anteil wie beispielsweise Rapsölmethylester) gewählt, da dieser Treibstoff für die großen Fahrzeuge unter Tage eingesetzt wurde und diese somit eine Emissionsquelle der untersuchten SVOC-Aerosole darstellten. Zur Untersuchung der substanzspezifischen und zeitabhängigen Durchbruchvolumina der Denuder wurde ein „Combustion Aerosol Standard (CAST)“ Flammrußgenerator mit Diesel B0 eingesetzt. Dafür wurden die Denuder in Kombination mit Adsorbern (in Strömungsrichtung) am Auslass des CAST montiert und jeweils 10, 15 und 20 min mittels batteriebetriebener Pumpen (GilAir Plus, Sensidyne, USA) mit einer Flussrate von 0,5 l/min beladen. Vor dem Denuder wurden Filter zur Partikelabtrennung angebracht. Untersucht wurden die Durchbrüche von Naphthalin- sowie Dodecandämpfen. Die im Denuder sowie Adsorber gefundenen Massenkonzentrationen der beiden Substanzen wurden mittels einer Thermodesorptionseinheit (Shimadzu, Japan), gekoppelt an ein Gaschromatographie-Massenspektrometer (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Japan) (TD-GC-MS), analysiert.

### 3.2.2 Silikon-Denuder

Als Alternative zu den „Multi-Channel Silicone Rubber Traps“ wurde ein größerer und mit GGP-Sammlern kompatibler Silikon-Denuder angefertigt. Dieser Denuder besteht aus einem Metallzylinder (Länge 36 mm, I.D. 30 mm) mit ca. 210 parallel eingebetteten Silikonkautschukschläuchen (Länge 36 mm, I.D. 1,47 mm, A.D. 1,96 mm) der Firma Freudenberg Medical, Deutschland. Der Denuder wurde im Hinblick auf die partikelgrößenabhängige Transmissionseffizienz experimentell untersucht. Dafür wurden Polystyrollatex (PSL) -Partikel mit einem geometrischen Durchmesser von 0,3, 0,99, 2 und 3 µm verwendet und mittels eines Aerosolgenerators des Typs ATM 220 (Topas, Deutschland) vernebelt. Die Partikeldetektion erfolgte mittels zweier zentral gesteuerter Sensoren eines optischen Weißlichtspektrometers des Typs 2200 (Welas digital 3000, Firma Palas, Deutschland). Weiterhin wurde die Sorptionseffizienz des Denuders in Abhängigkeit von verschiedenen Flussraten für *n*-Hexadecan- sowie Dibutylphthalatdämpfe modelliert. Hierbei wurde die empirisch modifizierte Form der Gormley-Kennedy-Gleichung für ringförmige „Annular-Denuder“ (Possanzini *et al.*, 1983) angewendet.



Abbildung 3: Silikon-Denuder mit parallel eingebetteten Silikonkautschukschläuchen.

### 3.2.3 "Neue" Aktivkohledenuder

Denuder sind in der Lage, die Gas- und Partikelphase von halbflüchtigen Verbindungen zu trennen. Die Gasphase eines Aerosolstroms wird an der inneren Oberfläche des Denuders adsorbiert, während die Partikelphase durchgelassen wird. Drei wesentliche Größen charakterisieren einen Denuder und legen seinen Einsatzbereich fest: i) Die Sorptionskapazität, definiert als die maximale Substanzmenge, die vom Denuder adsorbiert wird, ii) Die Gasphasen-Transmission, definiert als Verhältnis der Gaskonzentration am Ausgang zu der am Eingang und iii) die Partikel-Transmission, definiert als Verhältnis der Partikelkonzentration am Ausgang zu der am Eingang. Denuder gibt es aus unterschiedlichen Materialien in verschiedenen Formen und Größen (z.B. Silikon, beschichtete Keramik, Aktivkohle etc., als Röhre, als Doppelröhre und als Wabenkörper).

Die Aktivkohle-Denuder (Novacarb™), die im DGUV II-Projekt verwendet wurden, sind nicht mehr auf dem Markt erhältlich. Sie bestanden aus einem pyrolytisch aktivierten Phenol-Polymer-Wabenkörper (30mm Durchmesser, 36mm Länge, ~1,2mm Kanäle und ~0,75mm Wand, 210 CPSI<sup>1</sup>), (Kohlmeier et al., 2018 und 2019). Nach intensiver Suche nach einer Alternative haben wir mit der Firma Helsatech (inzwischen Teil von Mann&Hummel) gefunden, die ähnliche Aktivkohlewabenkörper herstellt. Die neuen Denuder sind gemischt aus Aktivkohle und Keramik (28mm Durchmesser, 38mm Länge, 400 CPSI), siehe (Abbildung 4).



Abbildung 4: Foto des "neuen" Aktivkohledenuders.

#### 3.2.3.1 Adsorptionskapazität und Abscheideeffizienz

Toluol wurde als Modellverbindung gewählt, um die Sorptionskapazität und die Abscheideeffizienzen (=1-Transmission) der neuen Aktivkohledenuder zu testen. Obwohl diese Verbindung für dieses Projekt nicht relevant ist, ermöglicht ihr hoher Dampfdruck (4 bis 6 Größenordnungen höher als z.B. Hexadecan und Dibutylphthalat) es

<sup>1</sup> CPSI = channels per square inch = Kanäle pro Quadratzoll

uns, eine sehr hohe Gasphasenkonzentration bei Raumtemperatur zu erreichen und "Worst-Case-Szenario"-Abschätzungen durchzuführen.

Wie in (Abbildung 2) dargestellt, wurde Toluol in der Diffusionsquelle verdampft und befeuchtet – der CAST war bei diesen Versuchen nicht in Betrieb. Die Gesamtkohlenwasserstoffkonzentration wurde jeweils abwechselnd vor und nach dem Denuder mittels Flammenionisationsdetektor (FID) bestimmt. Als Einströmkonzentration wurden  $40\text{mg}/\text{m}^3$  und  $130\text{mg}/\text{m}^3$  bei  $(24\pm 1)^\circ\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% eingestellt.

Zur Berechnung der theoretischen Transmission (P) wurde eine modifizierte Gormley-Kennedy-Gleichung für Rohrdenuder verwendet (Gormley und Kennedy, 1949; Cheng, 2011).

$$\mu = \frac{\pi DL}{Q} \tag{Gl. 1a}$$

$D$  Diffusionskoeffizient des Analyten [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]

$L$  Länge des Denuders [cm]

$Q$  volumetrische Flussrate [ $\text{cm}^3/\text{s}$ ]

$$P = 0.81905 \exp(-3.6568\mu) + 0.09753 \exp(-22.305\mu) + 0.0325 \exp(-56.961\mu) + 0.01544 \exp(-107.62\mu) \tag{Gl. 1b}$$

Für  $\mu > 0.02$

$$P = 1.0 - 2.5638 \mu^{2/3} + 1.2\mu + 0.1767\mu^{4/3} \tag{Gl. 1c}$$

Für  $\mu \leq 0.02$

Hinweis: Die volumetrische Flussrate (Q) musste durch die Anzahl der Kanäle (bei der untersuchten Geometrie: 324 pro Denuder) geteilt werden, um die volumetrische Flussrate eines Denuder-Kanals zu erhalten.

Die Diffusionskoeffizienten werden mit der Fuller-Gleichung berechnet (Fuller et al., 1969; Fuller et al., 1966). Für  $23^\circ\text{C}$  wurde der Diffusionskoeffizient von Toluol und Dibutylphthalat in Luft mit  $0,080$  bzw.  $0,046 \text{ cm}^2/\text{s}$  berechnet.

### 3.2.3.2 Transmissionseffizienz von kleinen Partikeln (< 0,3 $\mu\text{m}$ )

Kleine Partikel können prinzipiell via Diffusion an der Denuder Oberfläche abgeschieden werden (ähnlich wie gasförmige Substanzen, siehe Abschnitt. 3.2.3.1). Dieses sollte vor allem bei kleinen Denuderflüssen der Fall sein. Um die Transmission für Partikel < 300 nm zu überprüfen, wurde ein Aktivkohledenuder am Ausgang der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Rußpartikelquelle angeschlossen und mit Flüssen von 0,3 L/min, 1 L/min und 3 L/min betrieben. Zur Diese Messungen erfolgten ohne Befeuchtung der gereinigten Druckluft und ohne Zugabe von SVOC. Die Partikelanzahl vor und nach dem Denuder wurde abwechselnd mit einem Scanning Mobility Analyser Kondensationszähler (SMPS 3082 und CPC3025A, TSI, Aachen) größenklassenaufgelöst gemessen.

### 3.2.3.3 Transmissionseffizienz von großen Partikeln (> 1 $\mu\text{m}$ )

Die Transmissionseffizienz großer Partikel (2-10 $\mu\text{m}$ ) der neuen Aktivkohle-Denuder wurde mit Hexadecan-Partikeln getestet, die mit dem modifizierten TOPAS-Aerosolgenerator erzeugt wurden (Abschnitt 3.1.1). Vor allem bei großen Partikeln und hohen Flüssen können prinzipiell Partikel durch Impaktion an den Denuderstegen abgeschieden werden. Wie in (Abbildung 5) dargestellt, durchlaufen die Aerosolpartikel eine Kartusche mit einem Denuder (Set1) oder eine leere Kartusche (Set2). Der Quotient der Aerosolanzahlkonzentrationen dieser beiden Sets, die mit einem Aerodynamic Particle Sizer (APS 3321, TSI Inc, Aachen) gemessen wird, definiert die Transmissionseffizienz des Denuders. Die Partikelanzahlkonzentration für jedes Set wurde dreimal gemessen (jeweils ~10 Minuten), was eine Gesamtdauer von 30 Minuten für jedes Set und ein Gesamtexperiment von 1 Stunde ergibt. Der Gesamtfluss durch den Denuder ist die Summe aus dem APS-Fluss (1 L/min) und dem variablen Fluss der Pumpe. Der Gesamtfluss wurde auf 1, 5 und 15 L/min eingestellt, indem der Saugstrom Ansaugfluss der Pumpe auf 0, 4 bzw. 14 L/min gesetzt wurde.

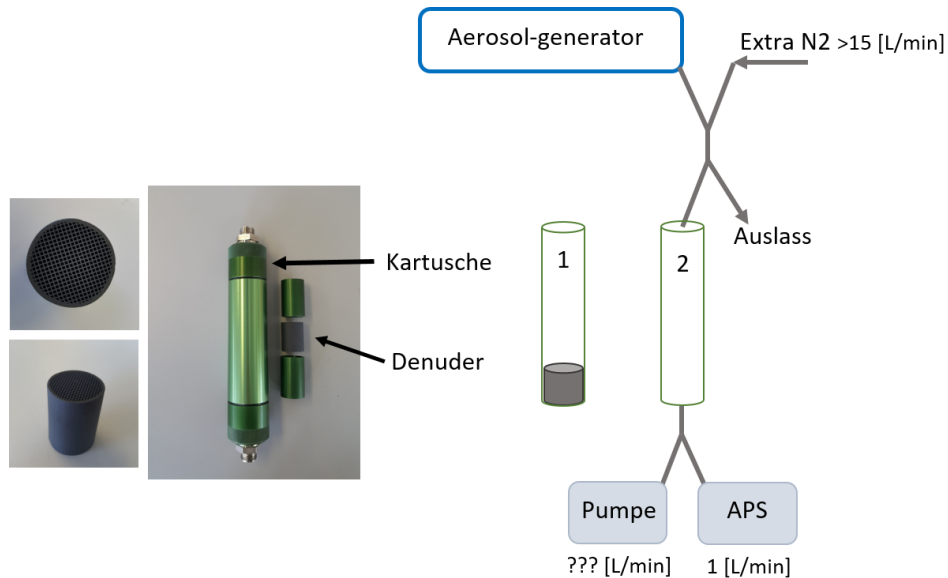


Abbildung 5: Der Aufbau zur Prüfung der Transmissionseffizienz von großen Partikeln ( $> 2\mu\text{m}$ ) durch die neuen Aktivkohle-Denuder. Die Anzahlkonzentration der Partikel wird mittels APS gemessen. Der Quotient des Sets mit einem Denuder (Set1) zu dem Set ohne Denuder (Set2) definiert die Transmissionseffizienz des getesteten Denuders.

### 3.3 Das neue Zellenexpositionssystem

Das VITROCELL ALI Expositionssystem besteht aus mehreren Modulen, von denen jedes 6 Positionen für ALI-Zellinserts besitzt. Drei der vier Zellpositionen werden für die Zellenexposition und die vierte Position für die Reinluftkontrolle verwendet. In Abbildung (6) ist ein Modul des Expositionssystems im Detail dargestellt. Der Luftstrom tritt in das System über eine Trompete ein, die sich über den Zellen befindet. Über 10 kleine Löcher, die mit einer Auslassleitung verbunden sind und um die Trompete herum positioniert sind, tritt der Fluss wieder aus. Auf der rechten Seite der Abbildung (6) ist die Rückseite des ALI-Expositionssystems mit seinem komplexen und langen Leitsystem dargestellt. Wir versuchen, das Aerosol-Leitsystem in unserem neuen Zellenexpositionssystem zu vereinfachen.

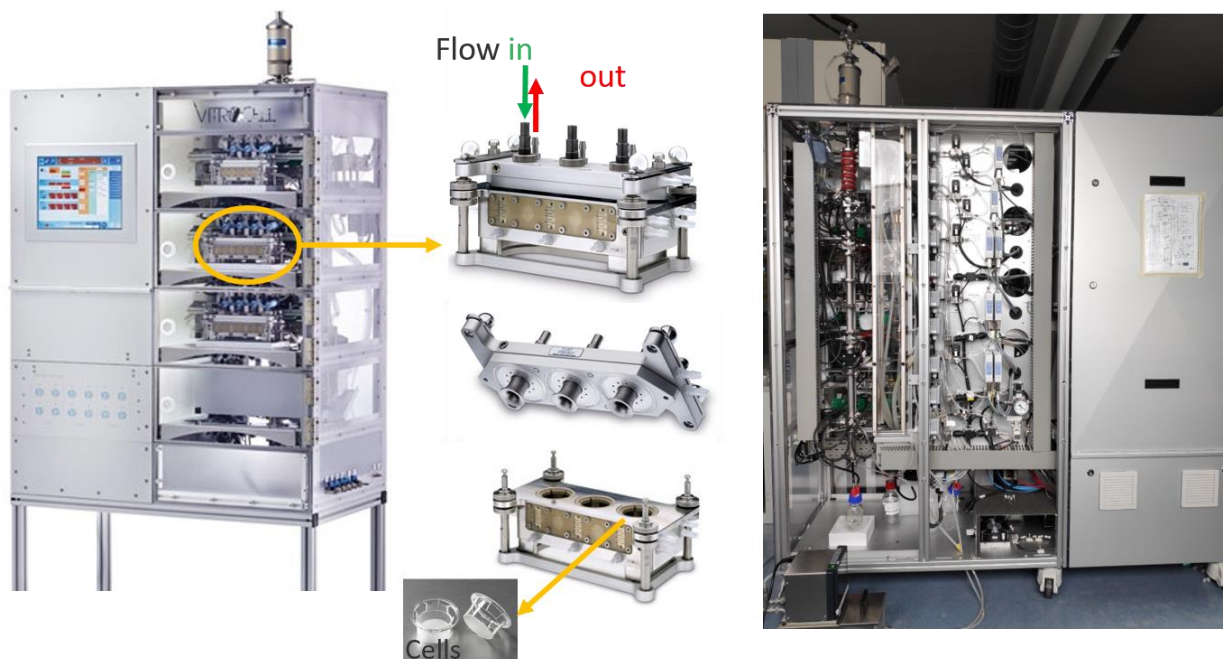


Abbildung 6: Das VITROCELL ALI-Expositionssystem mit Modulen für die Zellpositionen im Detail (links, mitte) und seinem komplexen Aerosol-Leitsystem im Hintergrund.

In dem neuen System wird das Expositionsmodul des ALI-Systems in einer engen Klimakammer untergebracht (ein Kühlschrank wurde so umgebaut, dass er als Klimakammer dient). Eine der Herausforderungen besteht darin, die Zellen während der Exposition bei 37 °C zu halten und den Fluss mit einer relativen Feuchte von  $\geq 85\%$  anzureichern. Zu diesem Zweck wird die Temperatur in der Klimakammer durch ein Wasserbad geregelt, das warmes Wasser durch ein Kupferrohr in die Klimakammer drückt. Ein Ventilator verwirbelt die warme Luft in der Klimakammer, wodurch die Temperatur von oben nach unten in der Klimakammer homogen ist. Die Temperatur in der Klimakammer wird dann auf 37 °C eingestellt, was für die Zellen am günstigsten ist (Abbildung 7). Nach ersten Zellexpositionen mit Reinluft im neuen System stellten wir Schädigungen in der ALI-Zellschicht fest (Zellen lösten sich ab). Verschiedene Parameter wurden untersucht und das System erhielt sukzessive immer neue Modifikationen. U.a. konnte die gewünschte Temperatur für Zellexpositionen im ALI-Modul (37 °C) nicht ausreichend durch die Lufterwärmung und Ventilation in der Klimakammer erreicht werden. Daher wurde kürzlich ein zweites externes Wasserbad installiert, um das Modul zu erwärmen. Das ALI-Modul hat einen Eingang und einen Ausgang zur Wasserzirkulation, wodurch die Module temperiert werden können und somit die Zellen auf der gewünschten Temperatur gehalten werden können. Mit Hilfe von Sensoren wurde die geeignete Temperatur des Wasserbads auf 37 °C eingestellt.

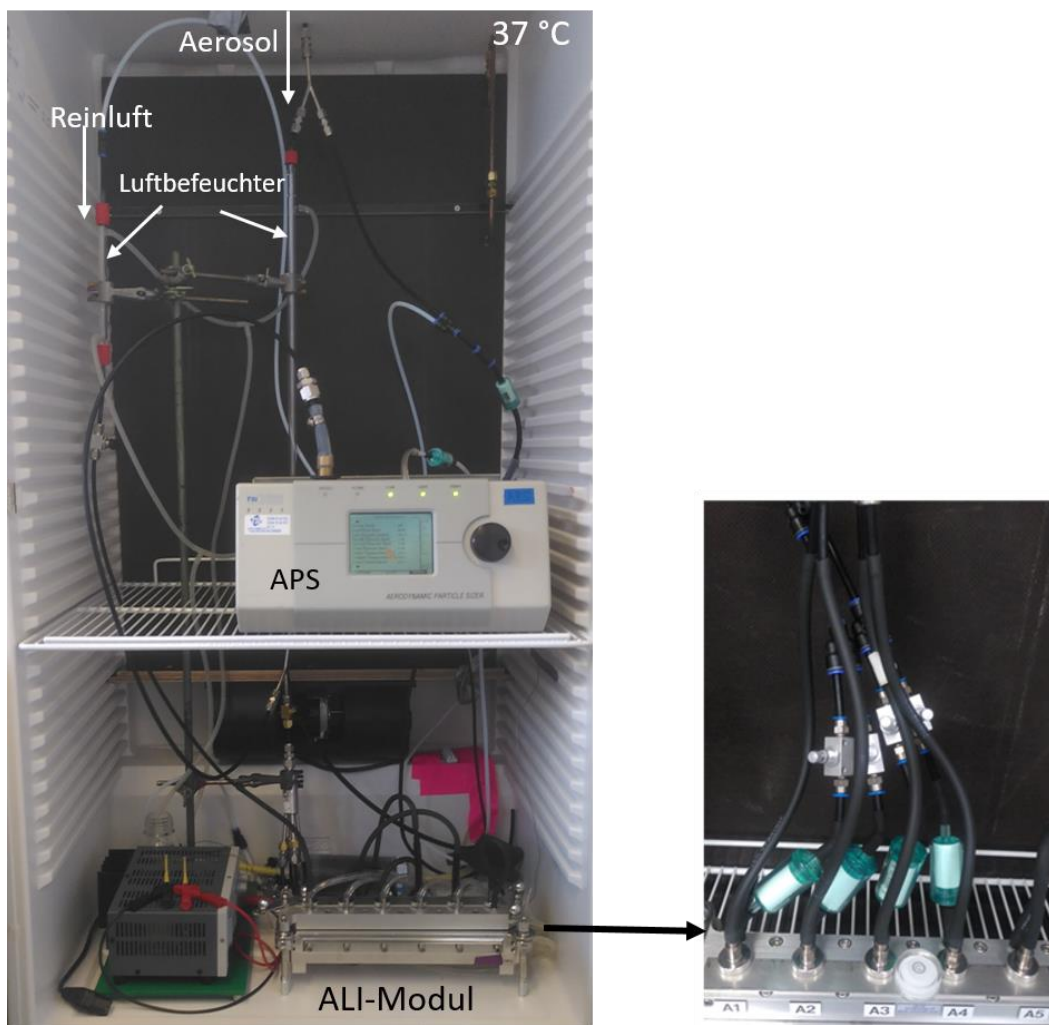


Abbildung 7: Aufbau des Zellenexpositionssystems in der Klimakammer (Kühlschrank). Die Reinluft und der Aerosolstrom passieren den Befeuchter und erreichen eine Luftfeuchtigkeit von mehr als 90 %. Die "Spinne" teilt den Hauptstrom in vier gleiche Ströme auf. Der Ausgang des Moduls ist an eine Vakuumpumpe (außerhalb der Klimakammer) angeschlossen, und mit Hilfe von vier kleinen Ventilen wird der Durchfluss auf 100 ml/min für jede Position eingestellt.



Zur Befeuchtung des Flusses wird ein neues Befeuchtungssystem verwendet. Eine Dialysemembran wird durch ein Glasrohr geführt und das Wasser fließt mit Hilfe einer Wasserpumpe (Zentrifugalpumpe) um die Membran herum. Während der Exposition wird der Fluss durch die Membran geleitet und somit befeuchtet. Je länger das Glasrohr ist, desto höher ist die relative Luftfeuchtigkeit im durchströmenden Fluss. Wir haben zwei Glasrohre mit verschiedenen Längen verwendet, ein etwa 20 cm langes und ein längeres Rohr von etwa 65 cm. Die an den Zellpositionen der Module gemessene Luftfeuchtigkeit betrug beim kurzen Befeuchter etwa 85 % und beim längeren Befeuchter etwa 95 %. In Abbildung 8 sind beide Befeuchter dargestellt.

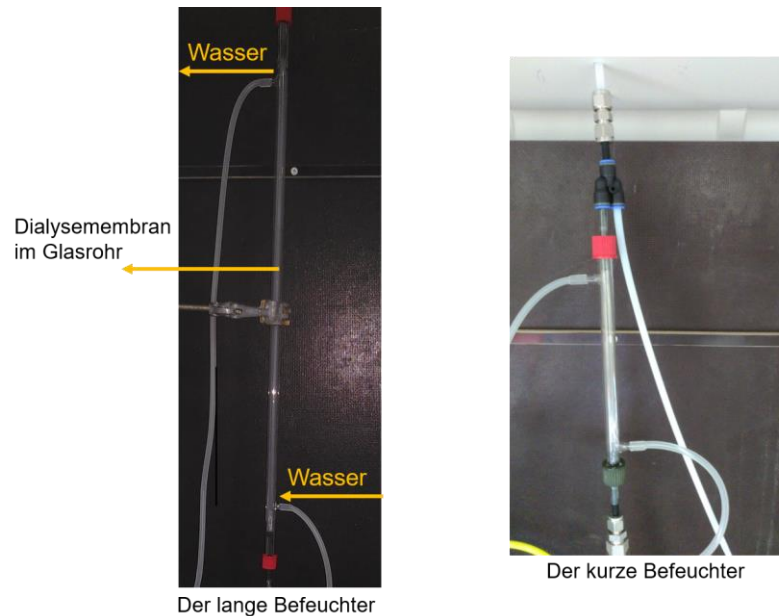


Abbildung 8: Langer und kurzer Luftbefeuchter. Eine Dialysemembran verläuft durch ein Glasrohr. Das Wasser wird mit einer kleinen Wasserpumpe durch das Glasrohr gepumpt.

Um die Zellexposition mit Partikel- und Gasphase getrennt durchführen zu können, müssen wir in der Lage sein, diese beiden Phasen für eine ausreichende Zeitspanne zu trennen, die für Laborexperimente erforderlich ist. Die Partikelphase von SVOCs kann in die Gasphase übergehen und umgekehrt, was von der Umgebung und ihren Bedingungen abhängt. Dieser Austausch findet solange statt, bis sich die Partikelphase im Gleichgewicht mit der sie umgebenden Gasphase befindet. In diesem Zustand ändert sich die Größe der Partikelphase nicht und die Menge der Gasphase bleibt gleich. Wird die Gasphase um die Partikelphase herum entfernt wird das Gleichgewicht gestört und die Partikel beginnen zu schrumpfen und in die Gasphase überzugehen, solange bis sie ein neues Gleichgewicht erreichen. Daher ist es eine physikalische Herausforderung die Partikelphase von SVOCs von ihrer Gasphase zu trennen. Die Menge der SVOC, die sich mit der Zeit zwischen diesen beiden Phasen bewegt, hängt stark von der Temperatur (T) und dem Dampfdruck der Verbindung ab.

In diesem Projekt wird Dibutylphthalat (DBP) als Zielverbindung ausgewählt. Um die Gas- und Partikelphasen voneinander zu trennen, werden Aktivkohle-Denuder und Glasfaserfilter verwendet. Die im Vorgängerprojekt (DGUV II) verwendeten Aktivkohle-Denuder sind nicht mehr verfügbar. Neue Aktivkohle /Keramik-Denuder wurden während dieses Projekts charakterisiert und die Ergebnisse wurden im letzten Jahresbericht vorgestellt. Zur Verwendung der Aktivkohle-Denuder für die Zellexpositionen wurden die Denudergrößen auf die Dimensionen des ALI-Systems angepasst. Um die Distanz zu den Zellen und somit etwaige Verschiebungen der Partikelzusammensetzung zu verhindern, werden die Denuder möglichst nahe an der zu exponierenden Zellschicht angebracht und in die Trompeten des ALI-Expositionsmoduls eingesetzt. Für die Glasfaserfilter zur Exposition mit reiner Gasphase wurde in unserer Werkstatt eine spezielle Halterung entworfen. Für Details siehe Abbildung (9).



Abbildung 9: Vier Denuder wurden aus dem ursprünglichen Denuder herausgeschnitten und im Inneren der Trompete so nah wie möglich an der ALI-Zellschicht platziert. In unserer Werkstatt wurde ein Filterhalter gebaut, um den Filter vor der Trompete zu platzieren.

In Abbildung (10) ist ein einfaches Schema des neuen Systems dargestellt. Der Aerosolstrom wird in die Klimakammer geleitet, wo er eine Befeuchtungseinheit passiert (Dialysemembran mit umgebendem Wasserdurchlauf). Der befeuchtete Luftstrom wird anschließend im Vierwegeverteiler („Spider“) auf die vier Zellpositionen im ALI-Modul aufgeteilt. Eine Position enthält einen Denuder der die Gasphase absorbiert und eine Exposition mit (annähernd) reiner Partikelphase gewährleistet. Einer weiteren Position wird ein Glasfaserfilter vorgeschaltet, wodurch reine Gasphase die Zellen erreicht. Als Reinluftkontrolle werden sowohl Denuder als auch Glasfaserfilter vor der Zellposition installiert (als zusätzlicher Test zum Vergleich mit der Reinluftkontrolle). Die letzte Zellposition wird mit dem Aerosol, ergo Gas- und Partikelphase, exponiert. Eine zusätzliche Reinluftkontrolle wird unabhängig vom Aerosol-Expositionssystem eingeführt. Hierzu passiert ein unabhängiger Reinluftzulauf einen zusätzlichen Befeuchter in der Klimakammer. Die Partikelgrößenverteilungen werden nach der Befeuchtungseinheit mit einem aerodynamischen Partikelmessgerät (APS 3321, TSI Inc, Aachen) gemessen.

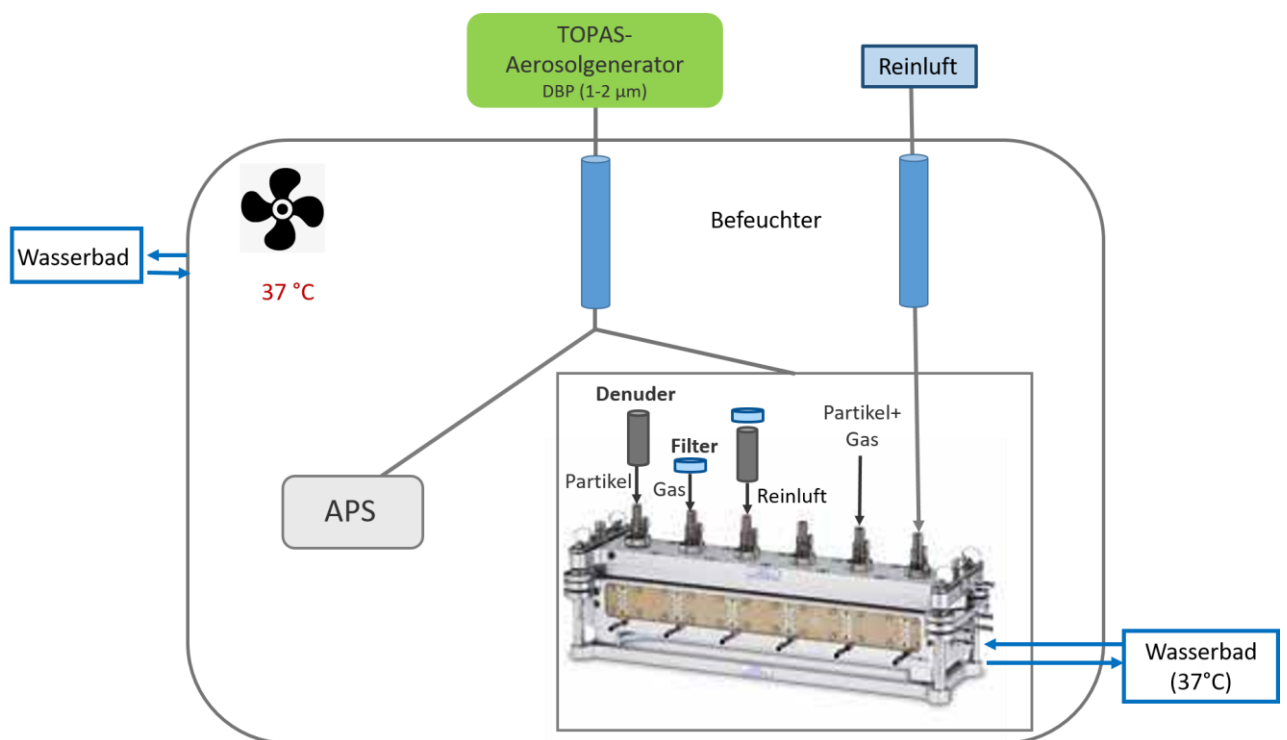


Abbildung 10: ein einfaches Schema des im Labor geplanten neuen Expositionssystems.

### 3.3.1 Zellexpositionen mit Reinluft

Im ersten Schritt wurden Experimente mit Reinluft durchgeführt. Sobald die Reinluft-Tests abgeschlossen wurden, wurden Expositionen mit der Zielsubstanz DBP durchgeführt.

Eine detaillierte Beschreibung des Expositionssystems ist in Abbildung (11) dargestellt. Reinluft (saubere Druckluft) wurde mit 1,5 bar in das Vitrocell® Expositionssystem geleitet. Vor dem Eintritt in die Klimakammer ist ein Überströmventil mit Manometer und Durchflussmesser installiert, um die Stabilität des Eingangsdrucks (Atmosphärendruck) und des Durchflusses während der Zellexposition zu überprüfen. Ein Gesamtfluss von 1,4 L/min wird durch die Befeuchtungseinheit geleitet. Die Befeuchtungseinheit besteht aus einem Glasrohr, das mit einer Wasserpumpe und einer Dialysemembran verbunden ist, durch die der Luftstrom geleitet und somit befeuchtet wird. Jede Zellposition erhält einen Fluss von 100 mL/min, während der Hilfsfluss (Reinluftexposition), den der Aerosol Particle Sizer (APS) während der Aerosolexposition (vorerst nur Reinluftexposition) erhält, auf einen Fluss von 1 L/min eingestellt ist. Der Durchfluss für jede Zellenexpositionsposition wird mit Nadelventilen an jeder der Auslasspositionen individuell eingestellt. Der Unterdruck der Vakuumpumpe liegt bei -0,8. Zur Reinigung des Abluftstroms wurde ein Aktivkohlefilter vor der Pumpe installiert. Für jede Position wurde eine Dichtheitsprüfung mit Hilfe eines Manometers durchgeführt. Zusätzlich werden Sensoren zur Überprüfung und Kontrolle der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit verwendet, da diese Parameter entscheidend für die Zellviabilität und die Integrität der ALI-Zellschicht sind. Es wurden zwei Kugelventile installiert, die eine unkomplizierte Zellexposition ermöglichen: Kugelventil 1 ist vor dem Durchflussverteiler (nach der Befeuchtungseinheit) und Kugelventil 2 nach der Konvergenz der einzelnen Abluftströme jeder Zellenexpositionsposition vor der Vakuumpumpe installiert.

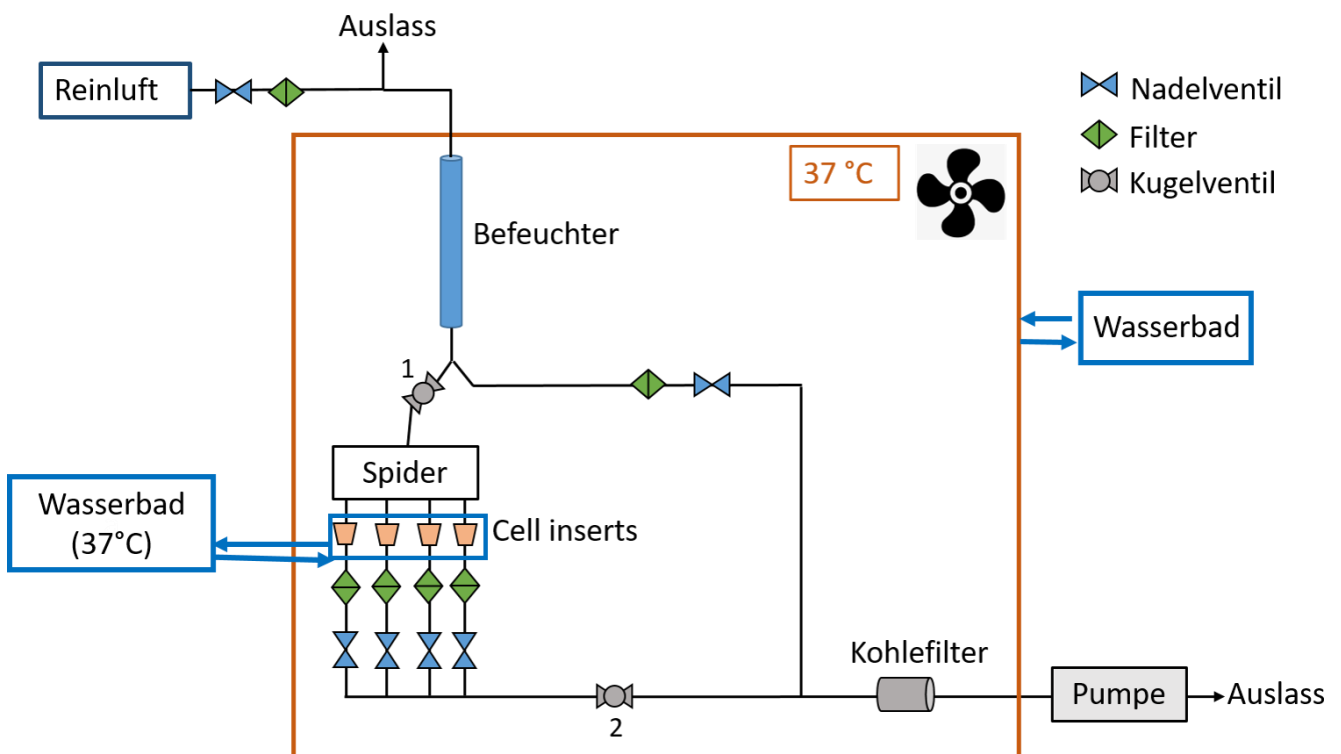


Abbildung 11: Das Schema der Zellexposition mit Reinluft im Labor.

Um die Verwendbarkeit des neuen Zellexpositionssystems zu bewerten, wurden Experimente mit Reinluft durchgeführt. Zur Überprüfung, ob die ALI-Zellschicht ihre Integrität bewahrt wurden bildgebende Verfahren verwendet, die die Identifizierung von lebenden und toten Zellen ermöglicht. Humane A549 Adenokarzinom-Zellen (ATCC CCL-185) wurden in DMEM/F-12 + GlutaMAX™-Medium (Gibco) kultiviert, das mit 5 % inaktiviertem fötalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert ist. Insgesamt 300.000 (300 k) Zellen per 6-Well-Transwell wurden auf einer porösen Polyestermembran (24 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße)

ausgesät. Vierundzwanzig Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen weitere 24 Stunden am ALI kultiviert und anschließend in der Klimakammer mit Reinluft exponiert. Für die Zellexposition wurden die auf Transwell-Membranen gewachsenen Zellen in das VITROCELL®-Expositionsmodul in der Klimakammer (37 °C) mit Expositionsmedium gegeben. Eine Negativ-Kontrollgruppe wurde während der Exposition im Expositionsmedium im Inkubator ohne CO<sub>2</sub> inkubiert und in jedem Experiment als Referenz verwendet, um mögliche toxische Wirkungen zu unterscheiden, die sich aus dem Expositionsverfahren ergeben. Nach Exposition in der Klimakammer wurden die Zellen anschließend für die bildgebende Analyse der lebenden und toten Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst (lebende Zellen) und Propidiumiodid (tote Zellen) gefärbt.

### 3.3.2 Zellexpositionen mit Dibutylphthalat (DBP)

Die Kultivierung der Zellen am ALI erfolgte wie in Sektion 3.3.1 Zellexposition mit Reinluft beschrieben. A549 Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden in dem neuen Expositionssystem mit DBP (Sig-ma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) exponiert. Nach der Exposition wurden die Zellen direkt für die toxikologische Analyse geerntet oder für weitere 20 Stunden mit vollständigem Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im ALI bis zur weiteren Analyse inkubiert. Positivkontrollen wurden entsprechend dem durchgeführten Assay verwendet.

Der modifizierte Aerosolgenerator TOPAS SLG 270 (siehe auch Abschnitt 3.1.1) wurde bei einer Sättigungstemperatur zwischen 86 und 88 °C und mit der Nachheizung zwischen 110 und 120 °C für die Erzeugung monodisperser Partikel mit einem mittleren aerodynamischen Durchmesser von 2 µm betrieben. Ein APS (Proben-Volumstrom 1 L/min) war innerhalb der Klimakammer in Flussrichtung abwärts der Befeuchtungseinheit installiert. Er registrierte sowohl Größe als auch Anzahlkonzentration der DBP Tröpfchen während der Expositions-Experimente. Die mittlere gemessene DBP-Größenverteilungen während der Zellexposition sind in Abbildung (12) dargestellt.

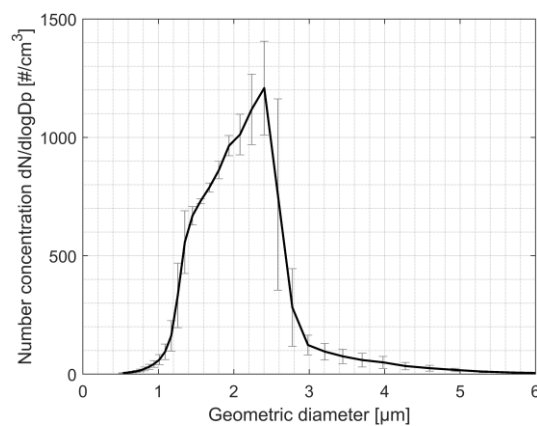


Abbildung 12: Mittlere Partikelanzahlkonzentration von DBP-Tröpfchen und Standardabweichung innerhalb der Messkanäle während der Zell-Expositionen.

## 3.4 Die Modelle und Berechnungen

### 3.4.1 Verdunstungsverhalten von großen Partikeln (Experiment vs. Modell)

Um das Verdunstungsverhalten großer Partikel zu untersuchen, wird ein neuer Aufbau im Labor verwendet (Abbildung 13). Nach entsprechender Optimierung konnten mit dem TOPAS-Aerosolgenerator (Abschnitt 3.1.1) auch Tetradecan-Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser bis zu 10 µm erzeugt werden. Wir verwendeten jeweils zwei Kartuschen in einer Reihe, wobei direkt am Ausgang der zweiten Kartusche ein APS angeschlossen ist, welches nach entsprechender Modifikation exakt 1L/min durch die Kartuschen saugt. In Set1 befand sich der Denuder am Boden der zweiten Kartusche, während sich in Set2 nach dem Denuder eine leere Kartusche befindet, was den Partikeln etwa 8 Sekunden Zeit gibt, um nach dem Denuder zu verdampfen. Diese 8 Sekunden ergeben sich

aus dem Durchfluss und dem Volumen der leeren Kartusche. Aus dem Verhältnis der gemessenen Partikelgrößen zwischen Set1 und Set2 wurde die jeweilige Verdunstungskinetik errechnet. Die Messung der Partikelkonzentration diente zur Kontrolle der Konstanz der Bedingungen und geht zusammen mit Temperatur, Diffusionskonstante und Sättigungsdampfdruck mit in die Berechnung ein.

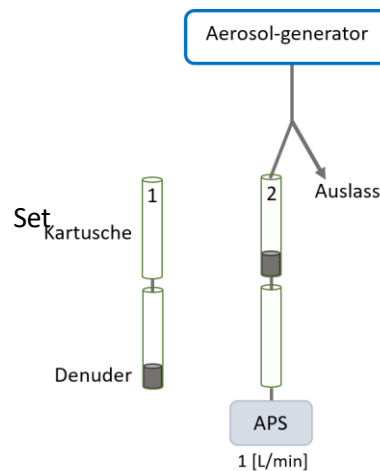


Abbildung 13: Der Aufbau im Labor zur Untersuchung des Verdunstungsverhaltens von großen Partikeln, die durch den modifizierten Aerosolgenerator erzeugt werden. Set1 und Set2, messen die Größe der Partikel nach 0 bzw. 8 Sekunden.

Die Verdunstung eines einzelnen Tropfens kann mit einer quasistationären Gleichung modelliert werden, wobei angenommen wird, dass das System nicht aus dem thermodynamischen Gleichgewicht gerät (Fuchs, 1959).

$$\frac{\partial m}{\partial t} = 2\pi d_p D (C_{sat} - C_{Luft}) \quad \text{Gl. 2}$$

- $M$  Masse des Tröpfchens
- $d_p$  geometrischer Durchmesser des Tröpfchens
- $D$  Diffusionskoeffizient der Dampfmoleküle der Substanz in der umgebenden Luft
- $C_{sat}$  Sättigungsdampfkonzentration an der Partikeloberfläche
- $C_{luft}$  Dampfkonzentration der Luft.

In unserem Fall haben wir eine von APS gemessene Größenverteilung im Größenbereich von etwa 0,5-20  $\mu\text{m}$  (51 Bins). Um die Verdunstung aller Größen gleichzeitig zu berücksichtigen, haben wir das Einzeltropfenmodell modifiziert. Bei jedem Zeitschritt wird die verdampfte Masse aus jedem Größenbin zur Gesamtdampfkonzentration der Substanz in der Luft addiert. Daher werden kleinere Partikel verdampfen und verschwinden, während größere Partikel in ihrer Größe schrumpfen werden.

Da das Verdunstungsverhalten eines Partikels von seinem geometrischen Durchmesser abhängt, wird der von APS gemessene aerodynamische Durchmesser unter folgenden Annahmen in den geometrischen Durchmesser umgerechnet und alle Ergebnisse unter Verwendung des geometrischen Durchmessers dargestellt.

$$\rho_{ae} d_{ae}^2 C_{ae} = \rho_p d_p^2 C_p \quad \text{Gl. 3}$$

- $\rho_{ae}$  Einheitsdichte (1 g/cm<sup>3</sup>)
- $d_{ae}$  aerodynamischer Durchmesser
- $C_{ae}$  Cunningham-Korrektur für  $d_{ae}$
- $\rho_p$  Partikeldichte (= 0,76 g/cm<sup>3</sup> für Tetradecan)
- $d_p$  geometrischer Durchmesser
- $C_p$  Cunningham-Korrektur für  $d_p$
- Angenommen  $C_{ae} = C_p$

Die Modellrechnungen sind empfindlich gegenüber dem Dampfdruck der getesteten Substanz (Tetradecan). Gemessene Dampfdruckdaten bei einer Temperatur <25 °C sind selten. Für Tetradecan bei einer Temperatur von

etwa 20 °C fanden wir Messwerte aus zwei verschiedenen Studien (Viton et al, 1997; Linder, 1931). Neben den experimentellen Daten haben wir auch Daten aus der Datenbank von ProSim (Prozesssimulationssoftware) verwendet. Diese Datenbank ist die Hauptquelle für thermophysikalische Eigenschaften reiner Komponenten und enthält aktualisierte und kontrollierte Eigenschaften zahlreicher Komponenten. In (Abbildung 14) ist der Dampfdruck von Tetradecan in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt.

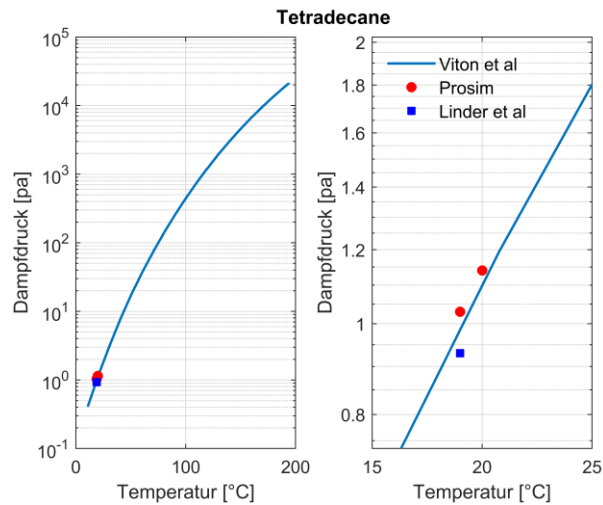


Abbildung 14: Der Dampfdruck von Tetradecan als Funktion der Temperatur. Experimentelle Daten aus (Viton et al) bei einem breiten Temperaturbereich, (Linder et al) bei 19 °C und ProSim-Datenbank bei 19°C und 20°C.

### 3.4.2. Gas-Partikel-Verteilung von Aerosolen bei zwei unterschiedlichen Stoffen

Die maximale Dampfkonzentration eines Stoffes in der Luft wird durch die Sättigungs-Dampfkonzentration dieses Stoffes begrenzt, welche allein von der Gastemperatur abhängt. Eine kurzzeitige Übersättigung kann auftreten, wird aber von – im Gasvolumen anwesenden – Aerosolteilchen in kurzer Zeit absorbiert. Die daraus resultierende Gas-Teilchen-Verteilung für ein Ein-Stoff-System ist einfach zu beschreiben:

- Ist die Teilchenkonzentration niedrig und die Sättigungs-Dampfdruckkonzentration nicht erreicht, verdunsten alle Teilchen.
- Erhöht man die Teilchen-Konzentration (und damit die Masse des Stoffes im Volumen), wird der Sättigungsdruck irgendwann erreicht und die Verdunstung der Teilchen endet.

Bestehen die Teilchen aus mehreren Stoffen, dann reduziert jeder Stoff den Dampfdruck aller anderen an der Teilchenoberfläche. In erster Näherung kann das mit dem Gesetz von Raoult (Molenbruch) beschrieben werden. Der weniger volatile Stoff bestimmt maßgeblich die Verdunstungszeit. Beispiele sind in DGUV, FP 299 (Abbildung. 47 und 48) beschrieben.

Die Verdampfung von Aerosolteilchen ist theoretisch in einem früheren Endbericht beschrieben worden (DGUV FP 299). Es benutzt Gleichungen für:

1. die Verdampfung von jeder Komponente, welche in einem Teilchen vorhanden ist,
2. die Massenzunahme von jeder Komponente in Luft (Massenerhalt der Teilchen und Luft),
3. die Interaktion der verschiedenen Komponenten an der Teilchenoberfläche (Gesetz von Raoult oder Molenbruch).

Die Berechnung erfolgt mit Hilfe einem Computer-Programm, dass in gleichen Bericht beschrieben worden ist. (Homepage CMA, Aerosol Physik, Projekte, Verdunstung von SVOC-Partikeln). Die Berechnungen sind für Tetradecan, Hexadecan und für ein Gemisch von beiden Stoffen bei einen Volumenverhältnis von 1:1 an Anfang der Verdunstung.

Eine Analyse für das Gleichgewicht von Zwei-Komponent-Teilchen hat ergeben, dass eine exakte Lösung zu erwarten ist. Die Lösung wurde so kompliziert, dass wir die Hilfe einer Spezialist des HMGU-Rechenzentrum eingeholt würde.

Dr. J. Obermaier konnte mit Hilfe des Programms Mathematica die Lösung des Problems finden. Siehe Appendix 1. Eine Verifizierung der Lösung war aus Zeitgründen noch nicht möglich.

### 3.4.3 Verdunstung und Lebensdauer von Dibutylphthalat-Partikeln

Gleichung 4 beschreibt die zeitliche Änderung des Teilchendurchmessers durch die Verdunstung. Die Lebensdauer des Partikels ist definiert als die Zeit ( $t$ ), die das Partikel benötigt, um zu verdampfen, und der Durchmesser, um Null zu erreichen ( $d_p(t) = 0$ ).

$$d_p(0)^2 - d_p(t)^2 = 8 D_p (C_{sat} - C_{Luft}) t / \rho \quad \text{Gl. 4}$$

$d_p(0)$  Partikeldurchmesser zum Zeitpunkt Null (0)

$d_p(t)$  Partikeldurchmesser zum Zeitpunkt ( $t$ )

$D_p$  Diffusionskoeffizient der Dampfmoleküle in der umgebenden Luft

$C_{sat}$  Sättigungsdampfdruckkonzentration an der Partikeloberfläche

$C_{Luft}$  Dampfdruckkonzentration der Luft

$\rho$  Partikeldichte

$t$  Zeit

Das Verdunstungsverhalten und die Lebensdauer von DBP hängen in hohem Maße von dessen Sättigungsdampfdruck ab, welcher ein Faktor der Temperatur ist. Der Diffusionskoeffizient ist leicht temperaturabhängig und hat keinen großen Einfluss auf die Lebensdauer. Für dieses Projekt sind zwei spezifische Temperaturen von Bedeutung (25°C als Arbeitsplatztemperatur und 37°C als Körpertemperatur für Zelleexperimente). Für den Dampfdruck von DBP bei 25°C und 37°C liegen keine experimentellen Daten vor. In vorhergehenden Studien (Hickman et al., 1937; Verhoek and Marshall, 1939) wurde eine Kurve an verfügbare experimentelle Daten für DBP bei verschiedenen Temperaturen angepasst. Die Kurve spiegelt die Beziehung zwischen Temperatur und Dampfdruck von DBP basierend auf experimentellen Daten wider. Die allgemeine Anpassungsgleichung lautet:

$$\log(p) = -\left(\frac{A}{T}\right) + B, \quad \text{Gl. 5}$$

Dabei ist  $p$  der Sättigungsdampfdruck [ $\mu\text{m Hg}$ ] und  $T$  die Temperatur [K]. In allen Berechnungen und Darstellungen wird die Einheit von  $p$  in Pascal [Pa] umgewandelt. Die Werte für  $A$  und  $B$  sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Die konstanten Werte für  $A$  und  $B$  in Gleichung 2 aus zwei unterschiedlichen Studien.

	A	B
Hickman, Hecker und Embree, 1937	4680	14.215
Verhoek und Marshall, 1939	5122	15.589

Zusätzlich zu den experimentellen Daten wurden DBP-Dampfdruckdaten aus der Prosim-Datenbank herangezogen. Prosim ist eine der wenigen Distributoren der DIPPR®-Datenbank (Design Institute for Physical Properties) von AIChE (American Institute of Chemical Engineers) und vertreibt Software für chemische Prozesssimulationen. Diese Datenbank ist die Hauptquelle für thermophysikalische Eigenschaften reiner Komponenten und enthält aktualisierte und kontrollierte Eigenschaften zahlreicher Komponenten. Schließlich wurde die Lebensdauer von DBP anhand von Dampfdruckwerten aus diesen drei unterschiedlichen Quellen berechnet.

### 3.4.4 Deposition von DBP-Partikeln in den Alveolen der menschlichen Lunge

Die DBP-Partikelkonzentration wird in der Literatur üblicherweise als Massenkonzentration ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) in der Expositionsluft angegeben und die Antwort der biologischen Systeme (Zellen, Tiere, Menschen) gemessen. Der eigentliche Effekt wird jedoch durch die – pro Zelle verfügbare – Dosis (Partikelanzahl oder -masse) hervorgerufen.

Im DGUV III-Projekt wird daher die präzisere zelluläre Dosis als Expositionsmaß verwendet. Ein Computer-Depositionsmodell wurde speziell für die Berechnung der zellulären Dosis in den ALI-Systemen erstellt. Die im "Cloud-ALI" (Sedimentations-Aufbau) und im "Flow-ALI" (Durchfluss-Expositionseinheit) erreichte Flächendosis kann somit derjenigen in der menschlichen Lunge vergleichbar gewählt werden.

Mit dem HPLD-Computer-Modell (Karg et al., 2020; Ferron et al., 2013) kann die Depositionswahrscheinlichkeit für Partikel in der menschlichen Lunge berechnet werden. Aus der modellierten Lungenstruktur ist auch die innere Oberfläche der Atemwege bekannt. Dadurch kann die Dosis auf der inneren Zelloberfläche des menschlichen Atemtraktes abgeschätzt werden. Da die exponierten Zellflächen in den verschiedenen Regionen der menschlichen Lunge von sehr unterschiedlicher Größe sind und da sie zudem aus unterschiedlichen Zellarten bestehen, ist es sinnvoll, die Dosis-Belastung für die einzelnen Lungenregionen separat zu berechnen.

Für die Zell-Experimente wurden DBP-Tröpfchen hergestellt und ihre Größenverteilung von einem aerodynamischen Partikel-Spektrometer registriert. Die Spektrometer-Daten wurden als Eingangsdaten für die Modellrechnung verwendet. Es wurde zudem angenommen, eine Person in Ruhe und ohne Arbeitsbelastung atme diese Tröpfchen während eines 4-stündigen Experiments (i.e. solange wie ein ALI-Zellexperiment dauert) ein.

Die Berechnungen basieren für orale Atmung auf der Studie von Karg et al. (2020) unter Verwendung der modifizierten Version des HPLD-Partikel-Lungen-Depositionsmodells von Ferron (2013) für polydisperse nicht-hygroscopische Aerosole. Dabei wird angenommen, dass die Partikel aus der Reinsubstanz DBP bestehen und sphärische Aerosol-Tröpfchen mit einer Dichte von  $1.05 \text{ g/cm}^3$  formen.

### 3.4.5 Modellierung der Zellexposition und theoretische Ansätze

Das von Vitrocell hergestellte Expositions-System Air-Liquid Interface (ALI) wird für Zell-Expositions-Studien in unserem Labor verwendet (siehe Abbildung 15a). Dieses System ist auf  $37^\circ\text{C}$  temperiert. Über ein kompliziertes Schlauchsystem wird das Aerosol befeuchtet und ein Aliquot auf Lungenzellen geleitet.

Für das aktuelle Projekt wurde ein zunächst neues Zell-Expositions-System entworfen, welches im Gegensatz zum originalen ALI-System einfacher aufgebaut sein sollte und dessen Verluste vor allem an großen Partikeln ( $>2,5 \mu\text{m}$ ) besser untersucht werden kann. Mit einer Simulationssoftware (COMSOL) haben wir einige neue Ideen dafür durchgespielt. Die Simulationsergebnisse zeigten jedoch, dass das ursprünglich konzipierte ALI-System eine höhere Depositionseffizienz und eine homogenere Partikelverteilung auf die Zellen bietet als das neu konzipierte System. Daher erläutern wir hier keine der neuen Ideen im Detail, da sie in diesem Projekt nicht verwendet werden.

Für das weiter verwendete Zell-Expositions-System wird die Original-Expositions-Kammer des ALI (Abbildung 15b) mit einem einfachen Schlauchsystem verbunden, um Verluste zu reduzieren und genauere Dosierungsberechnungen durchführen zu können. Während der Zell-Expositionen befindet sich das System in einer Klein-Klimakammer mit einer konstanten Temperatur ( $37^\circ\text{C}$ ).

Die Expositions-Kammer des ALI-Systems ist in Abbildung 15 detailliert dargestellt. Sie besteht aus einer „Trompete“, die den Aerosolfluss zu den Zellen leitet (Abbildung 15b), dem Zelleinsatz und der Kammer. Die Zellen sitzen auf dem Boden eines Zelleinsatzes (Abbildung 15c), welcher wiederum in die Expositions-Kammer eingesetzt wird (Abbildung 15b). Das Aerosol tritt von der Oberseite der Trompete (Einlass) in das System ein (siehe grüner Pfeil in Abbildung 15a). Das Aerosol entweicht über die Auslassöffnungen neben der Trompete (siehe roter Pfeil in Abbildung (15a)). Der Auslass saugt Luft über zehn kleine Löcher um die Trompete herum ab (Abbildung 15b).



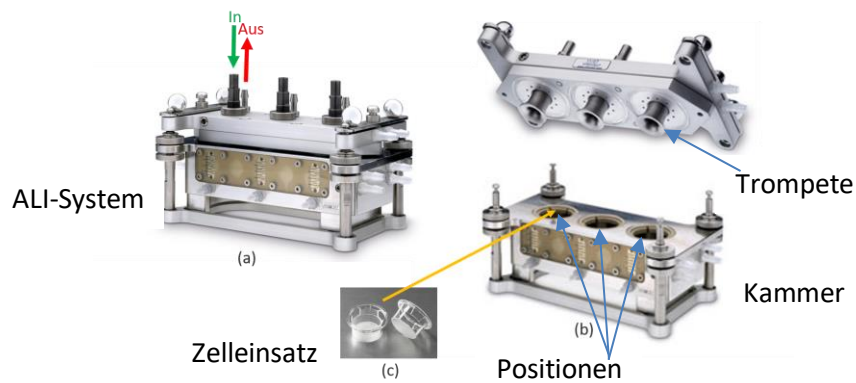


Abbildung 15: a) Ein Beispiel der Expositions-Kammer des ALI, im geschlossenen Zustand. Der grüne Pfeil zeigt den Zufluss in das System und der rote Pfeil den Abfluss aus dem System. b) Die offene Version des Systems. Die Trompetenform leitet den Aerosolfluss zu den Zellen. Der Abfluss wird über zehn kleine Löcher um die Trompete herum abgesaugt. c) Eine Probe des Zelleinsatzes. Die Zellen sitzen auf dem Boden des Zelleinsatzes; Der Zelleinsatz wird dann in die Expositions-Kammer gelegt (siehe gelber Pfeil).

### 3.4.5.1 COMSOL Multiphysik Simulationen

Um das Geschwindigkeitsfeld der Luft und die Übertragungseffizienz von Aerosolpartikeln im ALI-System zu simulieren, wurde die COMSOL Multiphysics Software herangezogen. Dazu wurde das CFD-Modul (Computational Fluid Dynamics) zusammen mit dem Partikelverfolgungsmodul der COMSOL Multiphysics®-Software verwendet. Im Partikelverfolgungsmodul können der Simulation verschiedene Kräfte hinzugefügt werden (z. B. Widerstandskraft, Schwerkraft und die Brownsche Bewegung). Im ersten Schritt wird eine einfache Geometrie entworfen, um die Größe und Form der Zell-Expositions-Kammer des ALI-Systems einschließlich der Trompete und des Zelleinsatzes darzustellen (Abbildung 16). Das Strömungsgeschwindigkeitsfeld wird unter Annahme der gleichen Strömungsrate am Ein- und Auslass modelliert. Im nächsten Schritt werden die Partikel mithilfe des Partikelverfolgungsmoduls zum Strömungsgeschwindigkeitsfeld hinzugefügt. Die Partikel sind durch ihren Durchmesser und ihre Dichte definiert. Die Partikelzahl, die pro Zeitabschnitt in das System gelangt, bestimmt die Partikelanzahlkonzentration. Das Erhöhen der Partikelzahl erhöht die Rechenzeit und verursacht etliche Einschränkungen.

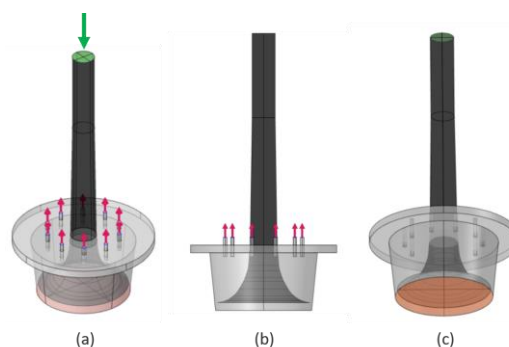


Abbildung 16: Die Geometrie der Zell-Expositions-Kammer des ALI-Systems für COMSOL-Simulationen. a) Der grüne Pfeil zeigt die Einströmung in die Trompete und die 10 roten Pfeile zeigen die Ausströmung über 10 kleine Löcher um die Trompete herum. b) Das Profil der Trompete, das die Aerosolströmung zu den Zellen führt. c) Die orange Oberfläche zeigt die Unterseite des Zelleinsatzes, in welcher sich die Zellen während einer realen Exposition befinden.

### 3.4.5.2 Theoretischer Ansatz für die Dosierberechnung (EXPOSITIONS-Modell)

In einem Zell-Expositions-System wird die auf die Zellen abgesetzte Dosis durch die Ablagerungseffizienz des Systems bestimmt. Die Depositionsdosis definiert, wie viel des gesamten Materials sich auf die Zellen abgelagert, was

eine entscheidende Tatsache bei Zell-Expositions-Studien ist. Aufgrund des Mangels an ausreichenden experimentellen Daten auf diesem Gebiet, werden theoretische Modelle benötigt, welche die Effizienz und Dosierung der Aerosoldeposition vorhersagen. Aus diesem Grund haben wir ein theoretisches Modell unter Verwendung der Programmiersprache MATLAB entwickelt, um die Depositionseffizienz des ALI-Systems zu berechnen. Wir bezeichnen dieses Modell als „EXPOSITIONS-Modell“, welches auf einer aktuellen Studie zur Aerosoldeposition in Vitrocell-Expositions-Systemen basiert (Lucci et al., 2018). Diese Studie stellt einen neuartigen theoretischen Ansatz zur Berechnung der Aerosoldepositionseffizienz dar. Trotz der vorherigen Studien verwenden wir in der aktuellen Studie keine Anpassungsparameter. Das EXPOSITIONS-Modell berücksichtigt die Diffusion und Sedimentation von Partikeln. Begriffe, welche im Zusammenhang mit Widerstandskraft, Gravitation und Brownscher Diffusion stehen, wurden in den Gleichungen berücksichtigt.

Die Haupteingaben sind wie folgt:

- Strömungsgeschwindigkeit
- Druck
- Temperatur
- Aerosol Eigenschaften (z. B. Größenverteilung, Partikelanzahlkonzentration, Partikeldichte)
- Geometrische Eigenschaften (z.B. Distanz zwischen Trompete und Depositionsplatte (h) und Depositionsplattenradius (r))

Die Hauptausgaben sind wie folgt:

- Depositionseffizienz ( $\eta$ ) [%] = (Anzahl der Depositionspartikel / Gesamtzahl der Partikel) \* 100
- Depositionsrate ( $\phi$ ) [# / sec] = Anzahl der abgelagerten Partikel / Sekunde

### 3.4.6 Berechnete und gemessene Deposition von DBP-Partikeln

Zur Qualitätssicherung des ALI-EXPOSITIONS-Modells wurden berechnete und gemessene Depositionsdosis miteinander verglichen.

Für das EXPOSITIONS-Modell wurde die – vom APS gemessene – Anzahlverteilung als Input verwendet (Abbildung 12) und die Parameter Aerosolfluss, Dichte von DBP und Temperatur auf 100 mL/min, 1,05 g/cm<sup>3</sup> bzw. 37°C vorgegeben.

Das Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) Verfahren wurde verwendet, um die deponierte Dosis zu messen. Für die Probenahme wurden die Transwell® -Einsätze sofort nach der Zelleexposition in *six-well-Nunclon*<sup>TM</sup>-Platten überführt und auf einem eisgekühlten Metallblock aufbewahrt. Unmittelbar danach wurde eisgekühltes Methanol (LC-MS-Qualität, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in das apikale Kompartiment der Einsätze gegeben, danach der interne Standard und Phthalsäure 3,4,5,6-d4-dibutylester (DBP-d4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Die Zellen wurden abgeschabt, die gesamte Zellsuspension gesammelt und die Einsatzmembran mit Methanol gewaschen; dies führte zu einer DBP-d4-Endkonzentration von 1 µg/ml. Um die restlichen Zellbestandteile zu entfernen, wurden die Proben 3 Minuten in einem Ultraschallbad extrahiert und 5 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt in HPLC-Fläschchen (Agilent, CA, USA) gefüllt und bei -80 °C bis zur Analyse LC-MS/MS System gelagert. Die Menge des abgelagerten DBP wurde in drei unabhängigen Experimenten gemessen.

Das LC-MS/MS-System besteht aus einem Agilent 1290 UHPLC (Agilent Technologies) Flüssigkeits-Chromatographie-System mit Entgaser, binärer Pumpe, Auto-Sampler und Säulenfach. Es ist mit einem Agilent 6470 MS/MS-Massenspektrometrie-System mit ESI-Quelle gekoppelt. Für die Trennung wurde eine Kinetex C18-Säule (2,6 µm, 100×3 mm i.d., Phenomenex, UK) bei 20 °C verwendet. Ein Probenvolumen von 5 µL wurde bei 20 °C injiziert. Die Messung erfolgte im Mehrfachreaktionsmonitoring im Positiv-Ionen-Modus unter Verwendung einer Gradiententrennung, beginnend mit 50% 0,1%iger Essigsäure (mobile Phase A) und 50% Methanol (mobile Phase B) mit einem konstanten Fluss von 300 µL/min bis hin zu 100% Methanol nach 15 Minuten. Zur Quantifizierung

wurden DBP (m/z 279 149) und DBP-d4 (m/z 283 153) Übergänge verwendet. Die Übergangs-Ionen DBP (m/z 279 205) und DBP-d4 (m/z 283 209) dienen als Qualifier-Ionen. Für die Quantifizierung wurde eine externe Kalibrierkurve mit DBP von 12 bis 500 ng/ml erstellt.

## 4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

### 4.1 Aerosolgeneratoren

#### 4.1.1 Modifikation des TOPAS-Aerosolgenerators für die Erzeugung großer Partikel

Der modifizierte Topas Aerosolgenerator wurde mit Hexadecan ( $C_{16}H_{34}$ ) und Tetradecan ( $C_{14}H_{30}$ ) getestet. Es wurden Partikel im Größenbereich von 2 bis 12  $\mu\text{m}$  stabil und reproduzierbar erzeugt. Einige der Größenverteilungen sind in (Abbildung 17) beispielhaft dargestellt.

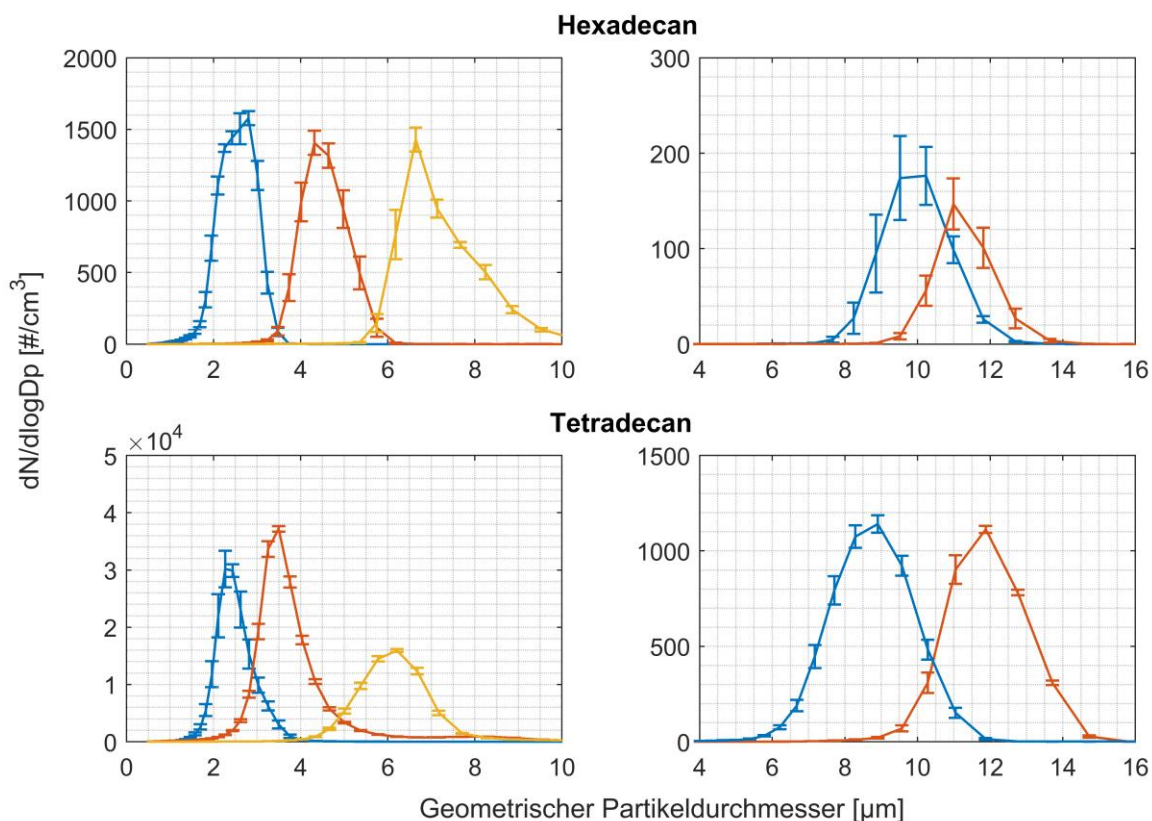


Abbildung 17: Größenverteilungen von großen Partikeln ( $> 2 \mu\text{m}$ ) erzeugt mittels durch den modifiziertem TOPAS-Aerosolgenerator. Die Messung des aerodynamischen Partikeldurchmessers erfolgte mit einem APS. Der dargestellte geometrische Durchmesser der Hexadecan und Tetradecan-Tröpfchen ist um den Faktor 1,14 bzw. 1,15 größer als der gemessene aerodynamische Durchmesser.

Die Dibutylphthalat (DBP) Partikel werden mit dem modifizierten TOPAS-Aerosolgenerator in unserem Labor hergestellt. In Abbildung 18 sind zwei Proben der erzeugten Größenverteilungen dargestellt, die mit dem APS gemessen wurden. Die Experimente zeigen, dass die Partikel mindestens über einen Zeitraum von 4 Stunden stabil sind.

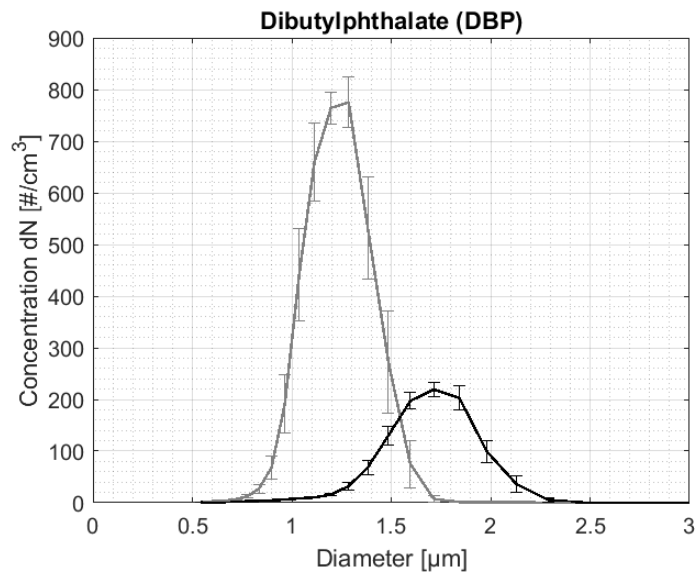


Abbildung 18: Zwei verschiedene Partikelkonzentration von Dibutylphthalat (DBP) bei unterschiedlichem Partikeldurchmesser [ $\mu\text{m}$ ], die mit dem modifizierten TOPAS-Aerosolgenerator erzeugt wurden.

#### 4.1.2 Erzeugung von Rußpartikeln mittels Combustion Aerosol Standard (CAST) Partikelgenerator

Der Laborprüfstand zur Erzeugung von Rußpartikeln wurde so optimiert, dass Rußpartikel mit einer Konzentration von  $0,1 - 1 \text{ mg/m}^3$  reproduzierbar erzeugt, befeuchtet und ggf. mit VOC belegt werden können. Ziel war es Rußpartikel mit hohem Anteil von elementarem organischem Kohlenstoff ( $>95\% \text{ EC}$ ) zu erzeugen, wobei der geometrische mittlere Mobilitätswachstumskoeffizient im Bereich 100 nm liegt. Abbildung 19 zeigt Anzahl- und Massenverteilung nach entsprechender Optimierung, die für mehr als acht Stunden konstant war. Die mittels eines TEOM (*tapered element oscillating microbalance*, TSI) gemessenen Partikelmasse lag bei  $1,0 \text{ mg/m}^3$ , die Anzahlkonzentration bei  $3,3 \times 10^6 \text{ #/cm}^3$ , der mittlere geometrische Anzahldurchmesser bei 85 nm, der mittlere geometrische Massendurchmesser bei 175 nm. Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten die fraktale Struktur der Rußpartikel, die aus 20-30 nm großen Einzelprimärpartikeln zusammengesetzt sind. Weitere Versuche bestätigten eine Langzeitkonstanz der Parameter über mehr als einen Monat.

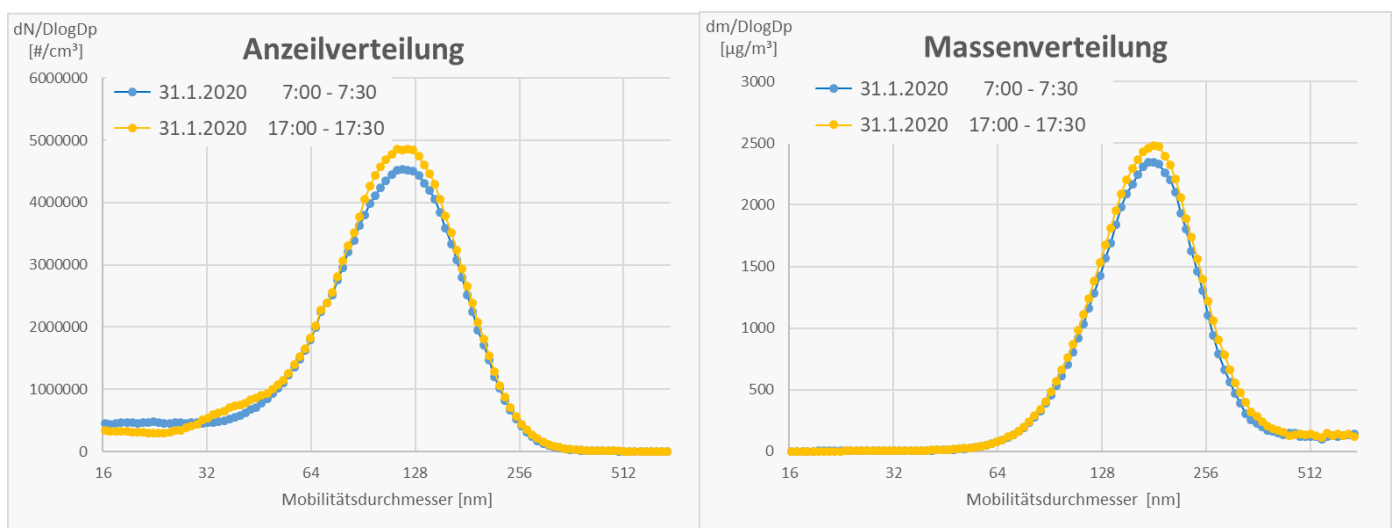


Abbildung 19: Anzahl- und Massenverteilung der produzierten Rußpartikel – dargestellt sind exemplarisch Halbstunden Mittelwerte am Anfang und gegen Ende des Messtages.

## 4.2 Gas-Partikel Trennung

### 4.2.1 Multi-Channel Silicone Rubber Traps

Um die Durchbruchsvolumina von Naphthalin- sowie Dodecandämpfen bei „Multi-Channel Silicone Rubber Trap“-Denudern zu untersuchen und miteinander zu vergleichen, wurden die jeweils im Denuder und Adsorber gesammelten Massenkonzentrationen beider Substanzen mittels eines TD-GC-MS quantifiziert. Die im Adsorber gefundenen Mengen an SVOC zeigten für beide Testsubstanzen, dass es bereits nach 10 min Beladungszeit im Denuder zu einem Durchbruch kam. Für Dodecan ist ein Trend zu steigenden Durchbruchsvolumina mit steigender Beladungszeit erkennbar, der aber durch die Streuung der Messwerte maskiert ist.

Tabelle 2: Durchbruchsvolumina von Naphthalin und Dodecan, abhängig von der Beladungsdauer der „Multi-Channel Silicone Rubber Trap“-Denuder mit der jeweiligen Substanz. Die Anzahl an wiederholten Messungen betrug fünf. Standardabweichungen sind als  $\pm$  Werte angegeben.

Substanz	Beladungsdauer [min]	Durchbruchsvolumen [%]
Naphthalin	10	40 $\pm$ 15
	15	28 $\pm$ 9
	20	29 $\pm$ 4
Dodecan	10	14 $\pm$ 12
	15	19 $\pm$ 14
	20	25 $\pm$ 20

### 4.2.2 Silikon-Denuder

Die partikelgrößenabhängige Transmissionseffizienz eines vertikal betriebenen Silikon-Denuders wurde bei einer Flussrate von 5 l/min bestimmt. Die höchste Transmissionseffizienz von 96  $\pm$  2.6 % konnte für 0,3  $\mu$ m große PSL-Partikel beobachtet werden. Die niedrigste Transmissionseffizienz von 93 % wurde hingegen für 0,99 und 2  $\mu$ m Partikel gemessen. Für 3  $\mu$ m Partikel konnte eine höhere Transmissionseffizienz von 95  $\pm$  10 % beobachtet werden. Allerdings muss hier der hohe Variationskoeffizient berücksichtigt werden, da im Vergleich zu den anderen Partikelgrößen, es bei der Verwendung von 3  $\mu$ m Partikeln zu einer ungleichmäßigeren Partikelerzeugung im Aerosolgenerator kam. Ein Abfall der Partikeltransmission mit steigender Partikelgröße, verursacht durch Impaktion an den Stirnflächen des Denuders, wurde nicht festgestellt.

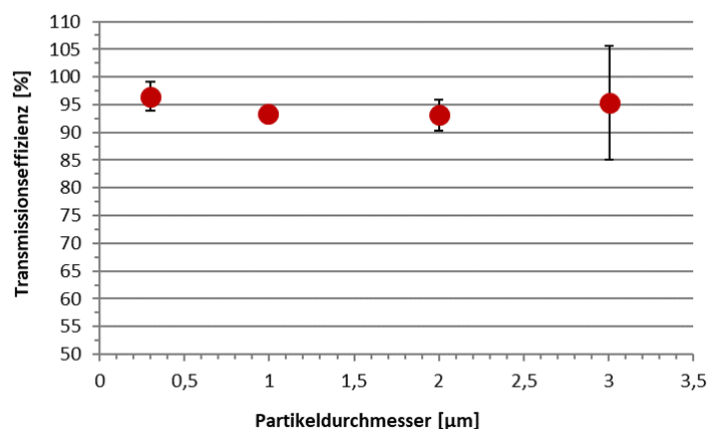


Abbildung 20: Partikelgrößenabhängige Transmissionseffizienz von einem Silikon-Denuder untersucht mit 0,3, 0,99, 2 und 3  $\mu$ m PSL-Partikeln bei einer Flussrate von 5 l/min. Die Anzahl an wiederholten Messungen betrug sechs. Variationskoeffizienten sind als vertikale Fehlerbalken angegeben.

Die theoretischen Sorptionseffizienzen eines Silikon-Denuders wurden für *n*-Hexadecan sowie Dibutylphthalat bestimmt. Die für die Berechnungen gewählten Flussraten entsprachen hierbei den Flussraten mit denen GGP-

Sammler betrieben werden. Da *n*-Hexadecan ( $4,49 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ ) und Dibutylphthalat ( $4,29 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ ) ähnliche Diffusionskoeffizienten aufweisen, ergaben die berechneten Sorptionseffizienzen für beide Substanzen nahezu gleiche Werte. Des Weiteren nahm mit steigender Flussrate die Sorptionseffizienz ab, da sich mit steigender Flussrate die Aufenthaltszeiten der Gasmoleküle im Denuder verringern. Aus diesem Grund können bei niedrigeren Flussraten mehr Gasmoleküle an der Denuderoberfläche sorbiert werden, was zu einer höheren Sorptionseffizienz führt.

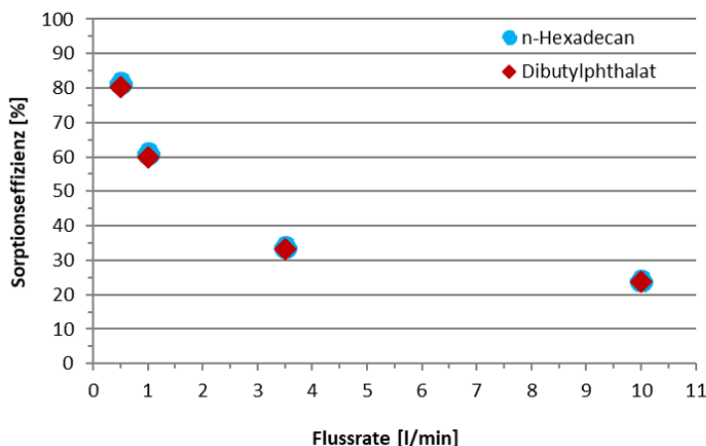


Abbildung 21: Theoretische Sorptionseffizienzen eines Silikon-Denuders für *n*-Hexadecan und Dibutylphthalat für verschiedene Flussraten (0,5, 1, 3,5 und 10 l/min).

#### 4.2.3 "Neue" Aktivkohledenuder

##### 4.2.3.1 Adsorptionskapazität und Abscheideeffizienz

Die Sorptionskapazität von Toluol in neuen Aktivkohledenudern ist extrem hoch. Die gemessene Sorptionskapazität nach 24 Stunden bei einer Zulaufkonzentration von  $40 \text{ mg/m}^3$  und einem Durchfluss von  $10 \text{ L/min}$  betrug etwa  $50 \text{ mg/g}$ , was  $0,56 \text{ g}$  Toluol pro  $12,7 \text{ g}$  Denudermasse entspricht. Es wurde ein sehr geringer Toluol-Durchbruch gemessen, selbst nach 24 Stunden war der Durchbruch geringer als  $2 \%$ . Der anfängliche Durchbruch  $< 0,2 \%$  entspricht  $< 0,15 \text{ ppmC}$ , was nahe der Nachweisgrenze des verwendeten FID liegt.

Im nächsten Schritt wurde Toluol in höherer Konzentration ( $250 \text{ ppmC} \sim 130 \text{ mg/m}^3$ ) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca.  $50 \%$  auf einen vorkonditionierten neuen Denuder mit unterschiedlichen Flussraten ( $3 - 5 - 20 \text{ L/min}$ ) aufgebracht. Selbst bei einem Durchfluss bis zu  $20 \text{ L/min}$  lag die Abscheideeffizienz über  $97\%$ .

Der mit den Gleichungen in (Abschnitt 3.2.3.1) berechnete Durchbruch wird mit den gemessenen Werten in Tabelle 3 für Toluol verglichen. Wie aus Gleichung vorhergesagt, steigt der anfängliche Durchbruch mit zunehmender Durchflussrate. Für größere Moleküle (z. B. Dibutylphthalat) ist der Diffusionskoeffizient geringer, was zu einer geringeren Abscheidung führt. Zum Beispiel ergibt die Modellrechnung bei einer Durchflussrate von  $10 \text{ L/min}$  einen Anfangsdurchbruch von  $0,5 \%$  für Toluol und von  $4 \%$  für Dibutylphthalat. Die berechneten Werte für Dibutylphthalat sind zum Vergleich in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Gemessene und errechnete theoretische Gasphasen-Transmission für Toluol und DBP

Gasfluss in NL/min	20.8	17.3	13.8	8.6	6.9	3.5
Toluol Transmission gemessen	2,6%	1,4%	0,54%	~0,08%	<0,08%	<0,08%
Toluol Transmission errechnet	3,1%	1,6%	0,60%	0,03%	<0,01%	<0,01%
DBP Transmission errechnet	12,5 %	8,6%	4,8 %	0,87 %	0,28 %	<0,01 %
Tetradecan Transmission errechnet	11,8 %	7,9 %	4,4 %	0,75 %	0,24 %	<0.01 %

#### 4.2.3.2 Transmissionseffizienz von kleinen Partikel (< 0,3 µm)

Rußpartikel, erzeugt mittels der in 3.1 beschriebenen Partikelquelle, wurden bei geringen Volumenströmen untersucht, um sicherzustellen, dass diese den Denuder ohne nennenswerte Verluste passieren können. Aufgrund von Diffusionsverlusten traten die größten Verluste bei kleineren Partikeln und kleineren Gasströmen auf: Der Mobilitätsdurchmesser der Partikel, für die eine noch akzeptable 90% Anzahl-Transmission<sup>2</sup> gemessen wurde, lag bei > 125 nm für 0,3 L/min, bei > 40 nm für 1,0 L/min und bei > 12 nm für 3,0 L/min. Bezogen auf die Partikelmasse, bzw. Massenkonzentration ist der Denuder für Flüsse > 1 L/min sehr gut geeignet, da der Massenanteil ultrafeiner Partikel bei einem typischen Arbeitsplatz aerosol i.d.R. sehr gering ist.

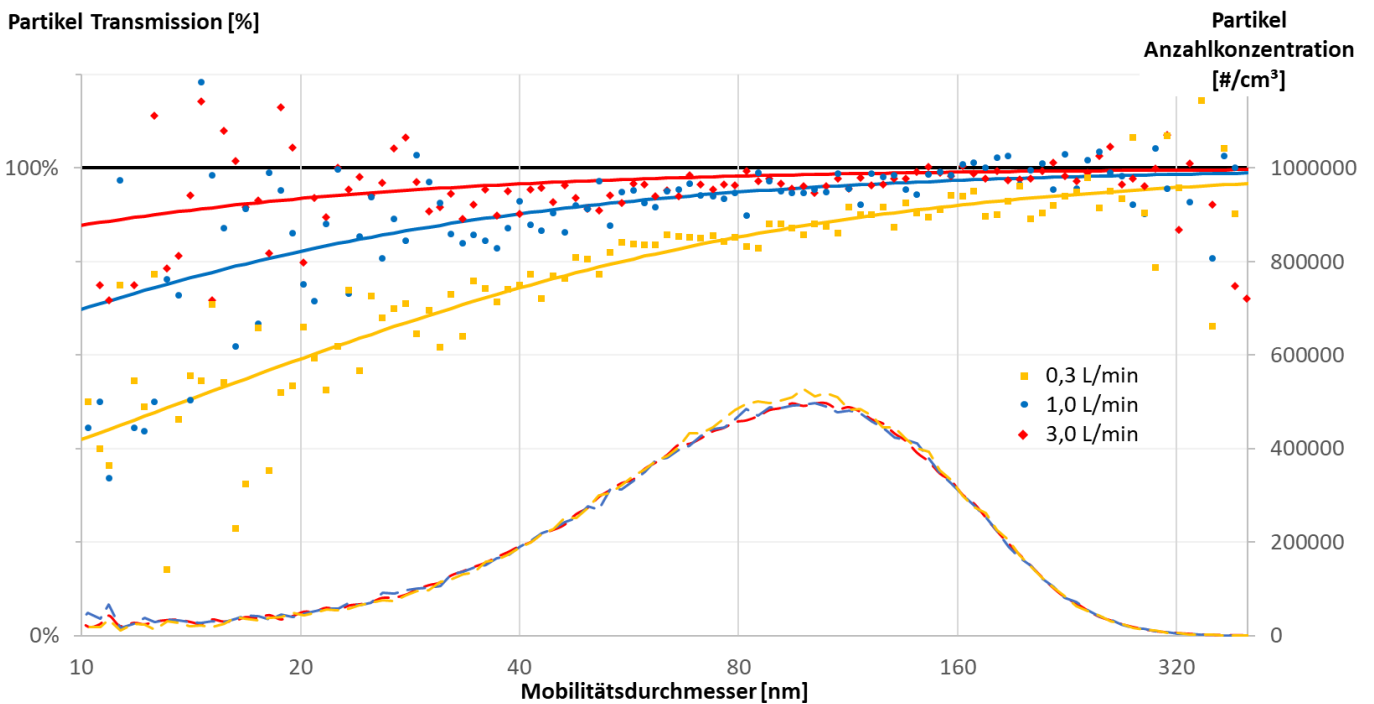


Abbildung 22: Messdaten der Partikelanzahltransmission in Abhängigkeit des Gasstromes durch den Denuder (linke Skala, Rohdaten der errechneten Transmission (Quotient aus Auslasskonzentration/Einlasskonzentration) und der gemittelten Anpassung (durchgehende Linie)). Die große Streuung der Partikeltransmission bei sehr kleinen (< 20 nm) und sehr großen (> 250 nm) Partikeln ist bedingt durch die geringe Anzahl der Partikel am Denudereinlass (Daten zur Partikel Anzahlgrößenverteilung: Gestrichelte Linie, rechte Skala).

#### 4.2.3.3 Transmissionseffizienz von großen Partikeln (> 1 µm)

Hexadecan ( $C_{16}H_{34}$ ) Partikel im Größenbereich von [2-10 µm] wurden mit dem modifizierten TOPAS-Generator hergestellt. Die Transmissionseffizienz dieser Partikel durch die neuen Aktivkohle-Denuder wurde für einen Gesamtdurchfluss von 1, 5 und 15 L/min gemessen. Siehe Abbildung 23 für weitere Details. Durch Impaktion an den Denuderstegen nimmt die Transmissionseffizienz der Partikel durch den Denuder mit steigender Partikelgröße und steigendem Durchfluss ab. Für hohe Gasflüsse von 15 L/min passieren >80% der Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von 2,5 µm, bei 5 L/min sind dieses >95% und bei kleinen Gasflüssen von 1 L/min wurde selbst bei 10 µm Partikeln keine signifikante Abscheidung beobachtet. Für Arbeitsplatzprobenahmen sollte der Gasfluss durch den Denuder daher kleiner-gleich 5 L/min sein, um auch PM<sub>2,5</sub> sicher zu erfassen. Treten Partikel

<sup>2</sup> Anzahl-Transmission = „Anzahlkonzentration nach Denuder“ / „Anzahlkonzentration vor Denuder“

> 2,5 µm auf (PM10), muss der Probenahmefluss bei der gegebenen Geometrie auf 1 L/min reduziert oder es müssen mehrere Denuder parallel betrieben werden.

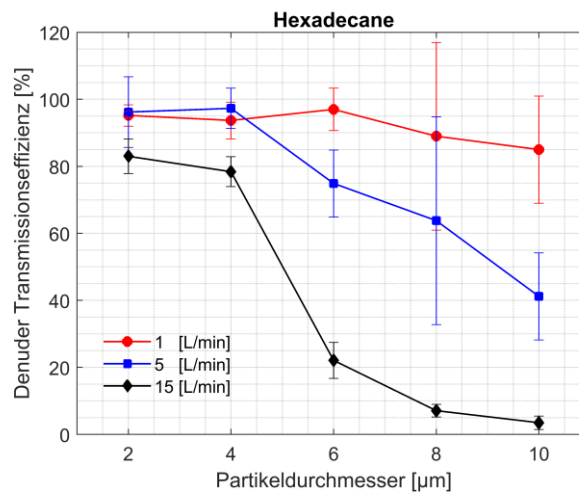


Abbildung 23: Der gemessene Transmissionsgrad von großen Partikeln durch die neuen Aktivkohle-Denuder als Funktion der Durchflussmenge. Hier ist der von APS gemessene aerodynamische Durchmesser aufgetragen. Der geometrische Durchmesser der Hexadecan-Partikel ist um den Faktor 1,14 größer.

### 4.3 Das neue Zellenexpositionssystem

#### 4.3.1 Zelleexpositionen mit Reingluft

Da 4 h Expositionen erfolgreich durchgeführt wurden (Abbildung 24), wurden A549-Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit sauberer Luft exponiert, um die Möglichkeit von Langzeitexpositionen zu demonstrieren und somit das Anwendungsspektrum des neuen Systems zu erweitern. Abbildung 25 zeigt die Auswirkungen des Systems und seiner Installationen auf die ALI-Zellschicht nach 24 h Exposition. Eine leichte Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen zeigte sich bei Exposition an Luft mit seriell eingebautem Filter und Denuder (Abbildung 25a). Die Position mit seriell Filter und Denuder war eine Ausnahme, da alle anderen Zellen, die sauberer Luft ausgesetzt waren, eine höhere Stoffwechselaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (NC) aufwiesen. Dies könnte auf eine höhere Anzahl toter Zellen zurückzuführen sein, die in der NC mit der Lebend/Tot-Färbung beobachtet wurden (Abbildung 25c). Die Zytotoxizitätswerte waren jedoch zwischen den Reingluft-exponierten Zellen und der NC vergleichbar (Abbildung 25b). Für die mit sauberer Luft exponierten Positionen, entweder mit Filter oder mit Denuder, zeigten die Endpunkte zur Bewertung der Integrität der ALI-Zellschicht weder einen Anstieg der Zytotoxizität noch eine Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen.

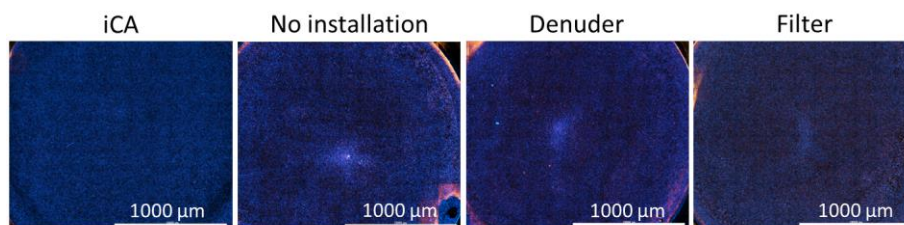


Abbildung 24: Fluoreszenzfärbung zur Identifikation lebender (blau) und toter Zellen (rot) auf den Transwell-Membranen nach 4 h Reingluftexposition in der Klimakammer. Intakte ALI-Zellschicht, wenn alle Parameter entsprechend eingestellt sind. Weder Aktivkohle-Denuder noch Glasfaserfilteranlagen beeinträchtigen die ALI-Zellschicht.



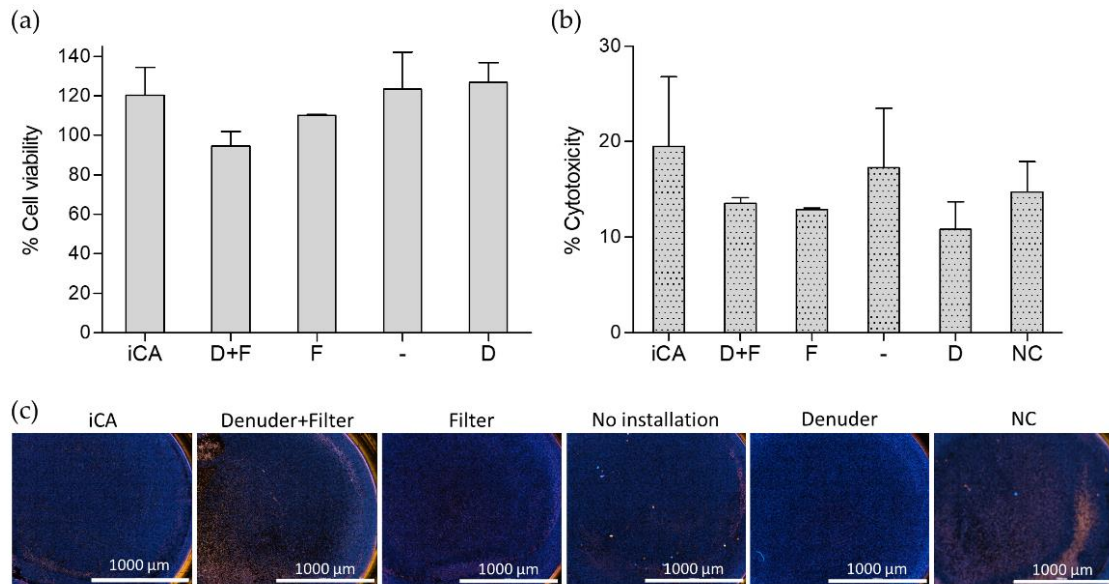


Abbildung 25: Expositionen mit Reinluft zeigten keine signifikanten Effekte in (a) Zellviabilität, (b) Zytotoxizität und (c) Membranintegrität mittels Färbung lebender und toter Zellen nach 24 h Exposition.

#### 4.3.2 Zellexpositionen mit Dibutylphthalat (DBP)

Zellexpositionen im neuen Expositionssystem mit Reinluft und den verschiedenen SVOC-Phasen von DBP zeigten keine Induktion von Zytotoxizität im Vergleich zur NC zu beiden Zeitpunkten - 4 h nach der Exposition mit und ohne 20 h Nachinkubation (PI) (4h Exposition und 4 h Exposition + 20h PI) (Abbildung 26a). Darüber hinaus war die Viabilität der A549-Zellen 4 h nach der Exposition mit DBP nicht beeinträchtigt (Abbildung 26b). Abbildung 26c zeigt repräsentative Bilder von lebenden/toten Zellen 4 Stunden nach der Exposition mit unabhängiger Reinluft (i-)CA, DBP-Gasphase (GP), Aerosol (AER), Partikelphase (PP) und der NC. Die Bilder zeigen, dass die ALI-Zellschicht ihre Integrität während der Exposition beibehält, ohne dass sich Zellen ablösen. Die Genotoxizität wurde unter nicht-zytotoxischen Bedingungen zu den jeweiligen Zeitpunkten bewertet, um störende Effekte von DNA-Schäden zu vermeiden, die möglicherweise durch einen erhöhten Zelltod induziert werden. Abbildung 26d und e zeigen die abgeleiteten DNA-Schäden nach Reinluft (i-)CA-, DBP GP-, AER- und PP-Exposition in A549-Zellen 4 h nach Exposition mit und ohne 20 h PI. Der basale DNA-Schaden der CA unterschied sich zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant von dem der iCA. Die alkalische Version des Comet-Assays (Abbildung 26d) und die mit Puffer behandelten Proben der Enzym-Version des Comet-Assays (Abbildung 26e) zeigen eindeutig einen signifikanten Anstieg der DNA-Strangbrüchläsionen bei der Behandlung mit den verschiedenen physikalischen Phasen von DBP im Vergleich zu den beiden Reinluftkontrollen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen DBP-Expositionsbedingungen zu den jeweiligen Zeitpunkten im Bezug auf die erhöhten DNA-Schäden beobachtet werden. Die Fpg-Enzymbehandlung zeigte eine signifikant erhöhte oxidative DNA-Schädigung bei der Behandlung mit AER im Vergleich zu Reinluft und GP, aber nicht zu PP (Abbildung 26e). Ausgeprägtere Effekte in Bezug auf DNA-Strangbrüchläsionen und alkalilabile Stellen wurden nach 4 h Exposition im Vergleich zu Zellen, die 4 h mit 20 h PI exponiert, festgestellt. Im Gegensatz dazu war die Potenz von DBP, oxidative DNA-Schäden in A549-Zellen zu induzieren, nach 20 h PI vergleichsweise höher.

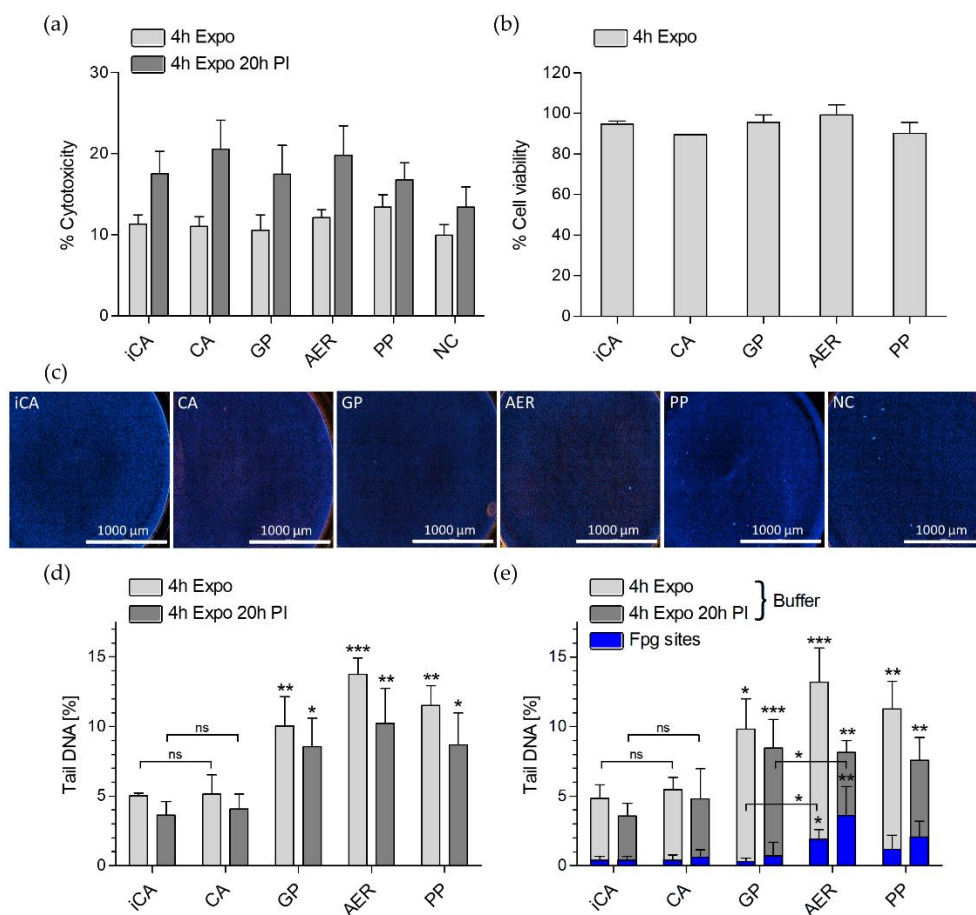


Abbildung 26: Bewertung der Toxizität von DBP-Gas gegenüber der Partikelphase und dem gesamten Aerosol auf A549-Zellen, die unter ALI-Bedingungen exponiert wurden. A549-Zellen wurden DBP über 4 h mit oder ohne 20 h Nach-Inkubation ausgesetzt (4h Expo oder 4h Expo 20h PI). (a) % Zytotoxizität im Vergleich zur NC, gemessen mittels LDH-Assay und normalisiert auf die gesamte LDH-Freisetzung (2% Triton X-100 Positivkontrolle) (n≥6), (b) % Zelllebensfähigkeit, gemessen mittels Resazurin-Assay und normalisiert auf die NC (n=3), und (c) Lebend/Tot Cell Fluoreszenzfärbung zur Identifikation lebender (blau) und toter Zellen (rot) mit 5 μg/mL H 33342 zur Färbung der Zellkerne (blau) und 2. 5 μg/mL Propidiumiodid (rot) zur selektiven Färbung toter Zellen nach 4 h Exposition mit iCA, CA oder den verschiedenen SVOC-Phasen von DBP. (d) Genotoxizität bewertet mittels (d) der alkalischen Version und (e) der Enzymversion mit Fpg des comet assays und den jeweiligen Pufferkontrollen (ohne Fpg) nach den jeweiligen Zeitpunkten (n≥3). iCA=unabhängige saubere Luft, CA=reine Luft, GP=Gasphase, AER=Aerosol, PP=Partikelphase, NC=Negativkontrolle. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Signifikanzen werden im Vergleich zur iCA des jeweiligen Zeitpunkts angegeben (statistische Analyse mittels Tukey One-way ANOVA, \*p ≤ .05, \*\*p ≤ .01, \*\*\*p ≤ .001).

## 4.4 Die Modelle und Berechnungen

### 4.4.1 Verdunstungsverhalten von großen Partikeln (Experiment vs. Modell)

Das Verdampfungsverhalten großer Tetradecan ( $C_{14}H_{30}$ )-Partikel wurde im Labor mit dem Aufbau in (Abschnitt 3.4.1) in einem Abzug bei einer Temperatur von ca. 20 °C gemessen. Die Partikel wurden 8 Sekunden lang verdampft. Der Vergleich von gemessenen und modellierten Daten ist in (Abbildung 27) dargestellt. Die modellierten Ergebnisse sind mit vier verschiedenen Dampfdruckwerten dargestellt. Im Vergleich zu den Experimenten prognostiziert das Modell eine erhöhte Verdampfung (mehr Schrumpfung der Partikelgrößen), dieses kann mehrere Gründe haben:

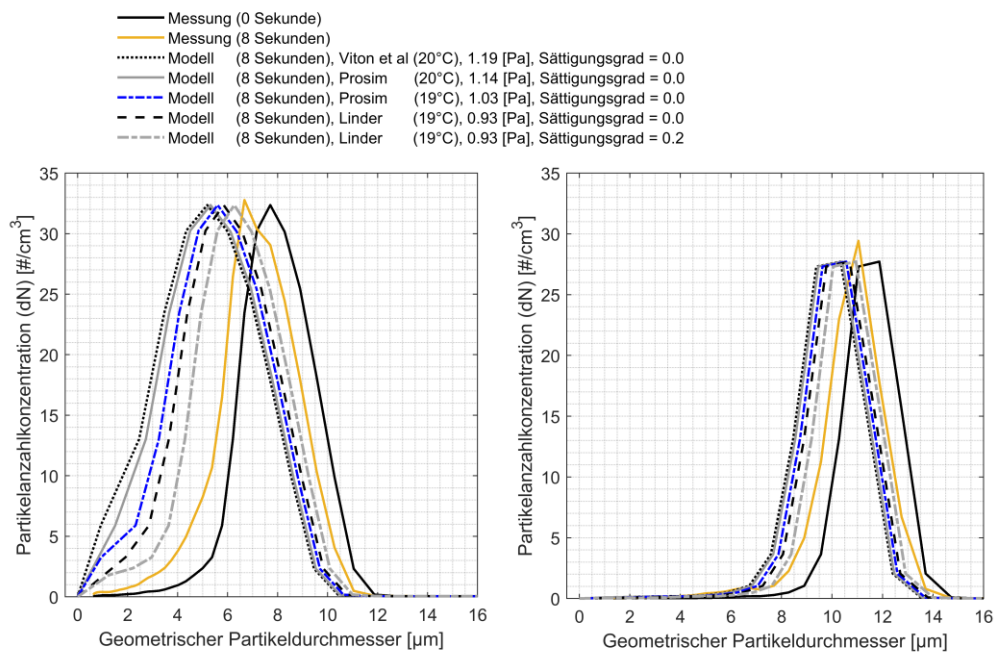


Abbildung 27: Vergleich zwischen gemessener und modellierter Verdampfung großer Tetradecan-Partikel (8 und 12 µm) nach 8 Sekunden. Das Modell wurde mit vier verschiedenen Dampfdrücken aus unterschiedlichen Quellen bei 19 und 20 °C verwendet. Ein Sättigungsgrad von 0,2 wurde ebenfalls getestet.

Obwohl die Gasphasenkonzentration von Tetradecan am Denuderausgang vernachlässigbar klein ist (siehe Tabelle 2), könnten vor allem große Partikel nach der Passage des Denuders an der Verengung der Kartusche impaktieren und dann bei Verdampfen von der Kartuschenoberfläche die Gaskonzentration wieder erhöhen. Hierfür spricht, dass Messungen und Modellrechnungen gut übereinstimmen, wenn man ein Sättigungsverhältnis von 0,2 annimmt (Abbildung 27).

Die Wärme, die dem Tropfen bei (partieller) Verdampfung entzogen wird, könnte die Temperatur um den Tropfen herum reduzieren. Diese Abkühlung durch Verdampfung ist im Modell nicht berücksichtigt. Das Modell und die Experimente stimmen bei niedrigeren Temperaturen (~16 °C) gut überein.

Ein weiterer Grund könnte der im Modell verwendete Dampfdruckwert selber sein. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit unserer Berechnungen bzgl. des Dampfdrucks sind präzise Dampfdruckwerte erforderlich. Der Mangel an präzisen gemessenen Dampfdruckdaten bei niedrigen Temperaturen (<25 °C) erschwert einen direkten Vergleich der modellierten und experimentellen Ergebnisse.

#### 4.4.2 Gas-Partikel-Verteilung von Aerosolen aus zwei unterschiedlichen Stoffen

Die nachfolgenden Berechnungen sind für eine Temperatur von 25°C und anfängliche dampffreie Luft durchgeführt worden. Weiter sind die Teilchen im Anfang allen gleich gross mit einem Durchmesser von 1 µm. Die Komponenten in dem Teilchen sind homogen gemischt.

Abbildung 28 zeigt die Verdunstung von 1 µm Teilchen bestehend aus einem Gemische von Tetradecan und Hexadecan bei einem Volumengemisch von 1:1 für verschiedenen Teilchenkonzentrationen. Ist die Teilchenkonzentration unterhalb einer Konzentration von  $8,5 \times 10^{10} \text{ m}^{-3}$  verdunsten die Teilchen vollständig. Bei höherer Teilchenkonzentrationen bleiben Partikel mit kleinerem Durchmesser erhalten. Die Zeit um das Gleichgewicht der Verdunstung zu erreichen liegt oft in der Nähe von den Zeit, welche ein 1-µm-grosses Teilchen mit den weniger volatile Stoff benötigt um zu verdunsten. Für ein einzelnes Tetradecan- oder Hexadecan-Teilchen ist die Verdunstungszeit 0,30 oder 1,17 s. Nur für die Teilchenkonzentrationen um  $8,5 \times 10^{10} \text{ m}^{-3}$  werden erheblich längeren Stabilisierungszeiten berechnet. Bei dieser Teilchenkonzentration verdunsten alle Teilchen verdunsten

und die Luft ist gesättigt. Ähnliche Ergebnisse zeigten Berechnungen für Mischverhältnisse von 9:1, 3:1, 1:3 und 1:9 für Tetradecan und Hexadecan.

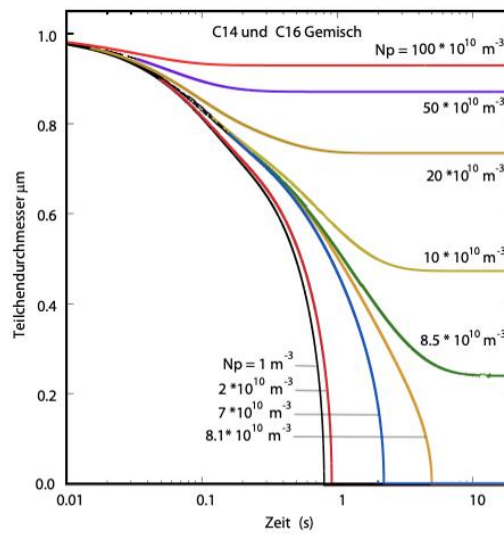


Abbildung 28: Verdunstung von 1 µm Teilchen bestehend aus einem Tetradecan und Hexadecan mit einem 1:1-Volumenverhältnis für verschiedenen Teilchenkonzentrationen  $N_p$ .

Abbildung 29 und B zeigen die Verhältnisse der Masse in Aerosolteilchen zur Gesamtmasse für Tetradecan (A) oder Hexadecan (B). Diese Abbildungen zeigen die deutlich langsamere Verdunstung der Teilchen bei einer Teilchenkonzentration von  $8,5 \times 10^{10} \text{ m}^{-3}$ . Ein Gleichgewicht stellt sich erst viel später ein im Vergleich mit der Lebensdauer eines einzelnen Teilchens im gleichen Luftvolumen (3 bis 10 s im Vergleich zu 0,9 s).

Berechnungen für quasi-monodisperse Teilchenverteilungen mit einer geometrischen Standardabweichung von 1.1 zeigen eine Verlängerung der Zeit von 50%, um das Gleichgewicht zu erreichen. Realistische Teilchenverteilungen haben eine geometrische Standardabweichung von 1.6. Deshalb wird erwartet, dass sich die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts noch weiter verschiebt. Eine zweite Beobachtung ist, dass die kleineren Teilchen vollständig verdunsten können. Wird zusätzlich der Kelvin Effekt berücksichtigt, so werden die kleineren Teilchen bevorzugt verdunsten und die größeren Teilchen wachsen (Kondensation).

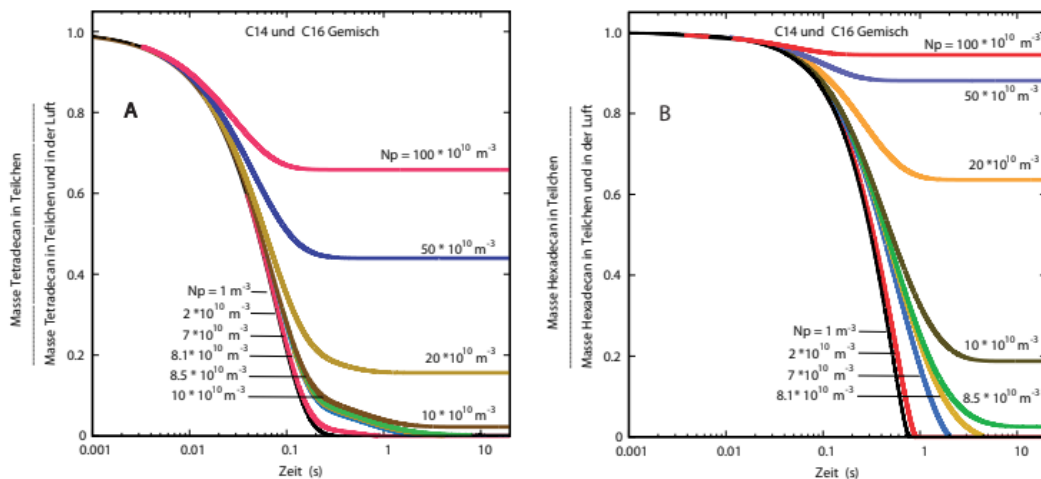


Abbildung 29: A) Das Verhältnis der Masse von Tetradecan in Teilchen zur Gesamtmasse Tetradecan in Teilchen und in der Luft als Funktion der Zeit für unterschiedliche Teilchenkonzentrationen  $N_p$ . Das anfängliche Volumen-Mischungsverhältnis von Tetradecan und Hexadecan in den Teilchen ist 1:1. Die Temperatur ist 25°C und die Dampfkonzentrationen in der Luft sind null. B) Wie Abbildung 29A, jedoch für das Verhältnis der Masse von Hexadecan in Teilchen zur Gesamtmasse Hexadecan in Teilchen und in der Luft.

#### 4.4.3 Verdunstung und Lebensdauer von Dibutylphthalat-Partikeln

Für die Berechnung des Verdunstungsverhaltens und der Lebensdauer von Dibutylphthalat (DBP) wird der Sättigungsdampfdruck aus drei verschiedenen Quellen herangezogen. Die Dampfdruckwerte und ihre Quellen sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Der Sättigungsdampfdruck von Dibutylphthalat (DBP) aus drei unterschiedlichen Quellen plus Diffusionskoeffizienten bei 25°C und 37°C.

		Dibutylphthalat (DBP) Sättigungsdampfdruck [pa]		
Temperatur [°C]	Diffusionskoeffizient [m <sup>2</sup> /s]	Experimentell		Datenbank
		Hickman et al; 1937	Verhoek and Marshall, 1939	Prosim
25	4.52e-6	0.00440	0.00343	0.00341
37	4.85e-6	0.01780	0.01583	0.01510

In Abbildung 30a ist das Verdunstungsverhalten eines einzelnen 1 µm großen Partikels dargestellt. Die Teilchenkonzentration ist somit auf 1 Teilchen/m<sup>3</sup> eingestellt. Bei einer Verdunstung schrumpft der Partikeldurchmesser von 1 µm auf 0 µm. Die Zeit, in welcher das Partikel verschwindet, wird als Partikellevensdauer betrachtet. Die Lebensdauer eines einzelnen DBP-Partikels von 1 µm Durchmesser beträgt zwischen 14 und 16 Sekunden bei 37°C und etwa 60 bis 75 Sekunden bei 25°C. Somit ist die Lebensdauer von DBP bei 37°C etwa viermal kürzer als die Lebensdauer bei 25°C. Bei einer höheren Partikelkonzentration würde sich die Lebensdauer der Partikel verlängern.

In Abbildung 30b werden das Verdunstungsverhalten und die Lebensdauer von DBP für verschiedene Partikelanfangsgrößen berechnet (2 bis 8 µm). In dieser Abbildung wurde der Dampfdruck von (Verhoek und Marshall, 1939) bei 37°C verwendet. Die Lebensdauer der Partikel hängt stark von der ursprünglichen Partikelgröße ab, wobei größere Partikel eine deutlich längere Lebensdauer besitzen. In Zukunft können die Ergebnisse dieser Methode mit experimentellen Daten der gleichen Partikelkonzentration und –größe verglichen werden.

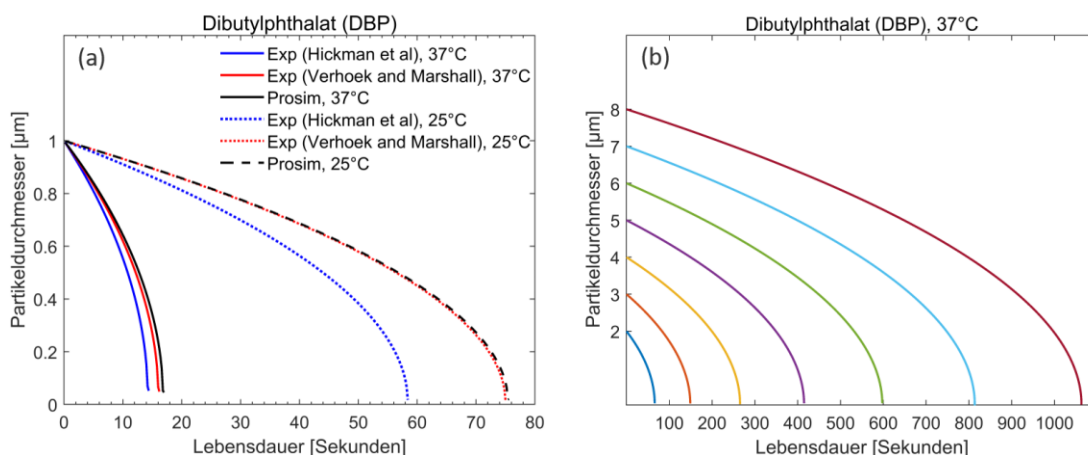


Abbildung 30: a) Das Verdunstungsverhalten eines einzelnen Dibutylphthalat (DBP) Partikels bei 25°C und 37°C. Für den DBP-Sättigungsdampfdruck werden verschiedene Quellen verwendet. b) Das Verdunstungsverhalten und die Lebensdauer von Dibutylphthalat (DBP) –Partikeln mit unterschiedlichen Anfangsgrößen unter Verwendung des Dampfdrucks von (Verhoek and Marshall, 1939) bei 37 °C.

#### 4.4.4 Deposition von DBP-Partikeln in den Alveolen der menschlichen Lunge

In den Experimenten mit humanen-Lungenzellen an der Luft-Medium-Grenzschicht wurde eine Oberflächen-Dosis von ca.  $50 \pm 10$  ng Dibutylphthalat (DBP) pro  $\text{cm}^2$  Zellfläche gemessen (Binder et al. 2021). Diese Dosis ist nur dann gesundheitsrelevant, wenn eine ähnliche Flächendosis auch beim Inhalieren des gleichen Aerosols in die menschliche Lunge erwartet werden kann.

Für die Zell-Experimente wurden DBP-Tröpfchen mit dem Kondensationsgenerator hergestellt und mit einem aerodynamischen Partikel-Spektrometer im luftgetragenen Zustand gemessen. Diese Messdaten (Tabelle 5) wurden als Eingangsdaten für die Modellrechnung verwendet. Es wurde zudem angenommen, eine Person im Ruhezustand atme diese Tröpfchen ein. Die Inhalationsdauer war auf 4 Stunden gesetzt, identisch mit derjenigen eines ALI-Zellexperiments. Die Parameter für die Modellierung sind in den Tabellen 6 und 7 angegeben.

Die Ergebnisse der Modellrechnung (Abbildung 31 und Tabelle 8) zeigen, dass die Kurvenform der Tröpfchenverteilung für Exposition und Deposition in erster Näherung ähnlich ist, dass jedoch die Flächen-Dosis mit der Lungentiefe sehr stark abnimmt (um Größenordnungen, siehe Ordinaten der Grafiken). So ist die Dosis in der extra-thorakalen Region drei- bis viertausendmal so hoch wie im Mittel über den gesamten Atemtrakt, in der tracheo-bronchialen Region immer noch mehr als 20-mal so hoch und in der Alveolar-Region, d. h. im Gasaustauschbereich der Lunge, weniger als halb so hoch (Tabelle 8, rechte Spalte).

Die für die ALI-Experimente genannte Oberflächen-Dosis ( $50 \text{ ng/cm}^2$ ) liegt fast bei derjenigen, welche mit dem Depositionsmodell für denselben Zeitraum im Bronchialbereich gefunden wird ( $72 \text{ ng/cm}^2$ ; Tabelle 8, 2.Spalte). Dies zeigt, dass – bei geeigneter weiterer Verdünnung – mit den ALI-Experimenten der Dosisbereich des tracheo-bronchialen und alveolaren Region des menschlichen Atemtraktes relevant abgedeckt werden kann.

Tabelle 5: Parameter der Partikel-Größenverteilung für die Abschätzung des Depositionsdosis. CMD und MMD – medianer Durchmesser für Anzahl- und Massenverteilung;  $\sigma_g$  – geometrische Standardabweichung der Größenverteilungen; percentile – Percentile zur Berechnung von  $\sigma_g$ ; total – Partikelanzahl- bzw. Partikelmassenkonzentration bei einer Tröpfchendichte von  $1.05 \text{ g/cm}^3$ .

	<b>CMD</b>	<b>MMD</b>	
<b>median</b>	1.80	2.24	$\mu\text{m}$
<b><math>\sigma_g</math></b>	1.66	1.91	-
<b>percentile 16%</b>	1.35	1.80	$\mu\text{m}$
<b>percentile 84%</b>	2.24	3.44	$\mu\text{m}$
<b>total [#/<math>\text{cm}^3</math>]</b>	321	1.86	$\text{mg/m}^3$

Tabelle 6: Parameter für das Depositions-Modell. Hygroscopic growth – Hygroskopizität der Partikelsubstanz;  $f_s$  – Fraktion der Substanz (0 ... 1); inhaled – Inhalationspfad Mund / Nase;  $t_{in}$ ,  $t_{ex}$  – Zeit für Inhalation / Exhalation;  $t_{breath}$  – Dauer eines Atemzyklus;  $V_{tidal}$  – Atemzugvolumen;  $V_{minute}$  – Atemminutenvolumen

<b>Model Parameters</b>		
hygroscopic growth	non-hygroscopic	-
$f_s$	1	-
inhaled via	mouth	-
$t_{in} = t_{ex}$	2.50	s
$t_{breath}$	5	s
$V_{tidal}$	750	ml
$V_{minute}$	9.0	ltr

Tabelle 7: Innere Oberflächen des Modell-Atemtraktes. Es bedeuten *et* – extrathorakale Region; *tb* – tracheo-bronchiale Region; *al* – alveolare Region, luftführende Atemwege; *tl* – gesamte innere Oberfläche der Modell-Lunge

<i>region</i>	<i>area</i>	<i>unit</i>
<i>et</i>	117.5	cm <sup>2</sup>
<i>tb</i>	3 264	cm <sup>2</sup>
<i>al</i>	133 651	cm <sup>2</sup>
<i>tl</i>	75	m <sup>2</sup>

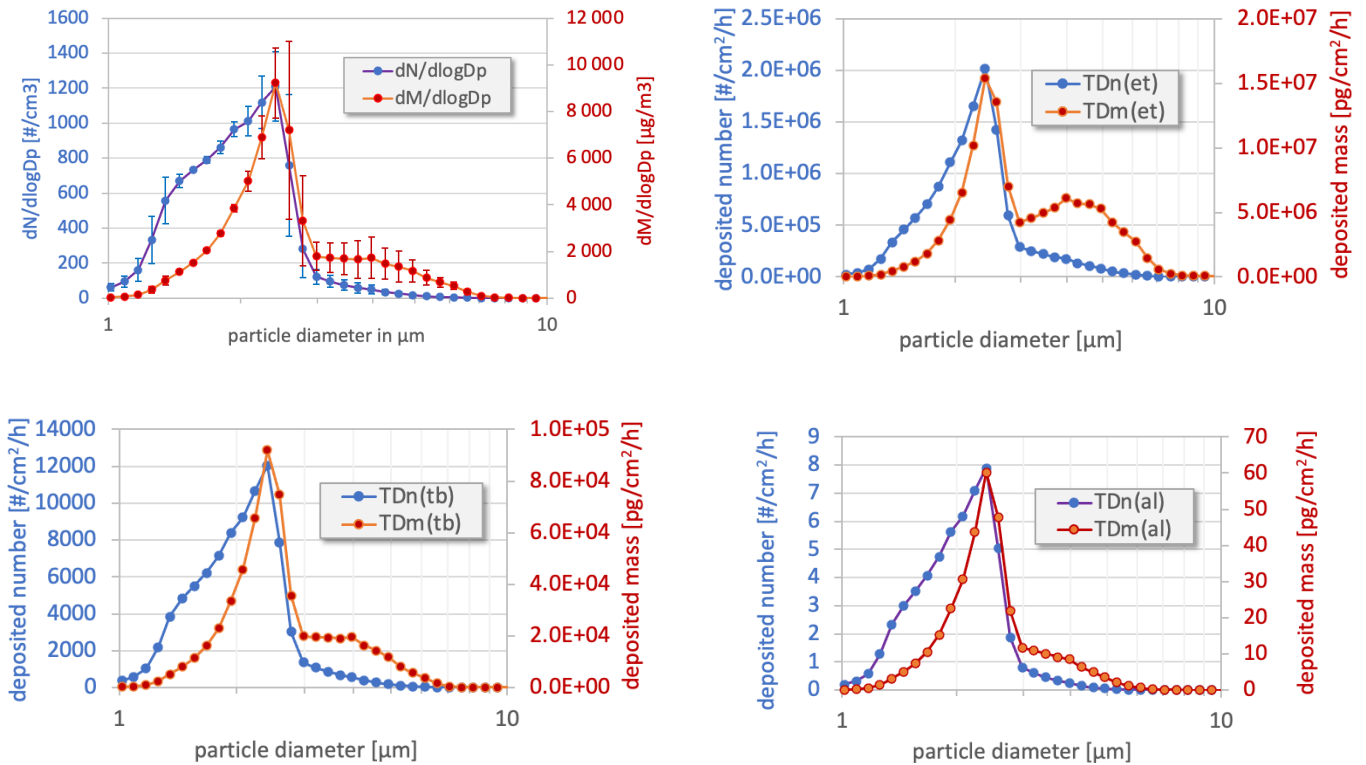


Abbildung 31: Im ALI-Experiment gemessene Tröpfchen-Größenverteilung. Oben links: ALI-Expositions-Größenverteilung im luftgetragenen Zustand, gemessen mit dem APS-Partikelspektrometer. Oben rechts: aus der luftgetragenen Konzentration mit dem Lungendepositionsmodell berechnete Partikelanzahl und Partikelmasse ( $TDn$  bzw.  $TDm$ ), welche pro Stunde auf einem cm<sup>2</sup> Lungenoberfläche der extra-thorakalen Lungenregion deponiert. Unten links:  $TDn$  und  $TDm$  für die tracheo-bronchiale Region; unten rechts:  $TDn$  und  $TDm$  für die alveolare Region. Aus dem Kurvenverlauf erkennt man, dass in der oberen Lunge (*et* und *tb* Region) die Partikelmasse bei 4 µm deutlich bevorzugt abgeschieden wird, während diese großen Partikel in der tiefen Lunge (*al* Region) weniger ankommen. Die großen Unterschiede zwischen den Regionen zeigen sich bei der Skalierung der Ordinaten. Die Grafik für die gesamte Lunge (*tl* Region) ist derjenigen für die *al* Region sehr ähnlich.

Tabelle 8: Ergebnis der Modellrechnung für die Oberflächen-Dosis im menschlichen Atemtrakt bei einer Expositionszeit von 4 Stunden. Die Expositionszeit wurde entsprechend der Länge der ALI-Experimente gesetzt. Es bedeuten: *TDn* – deponierte Partikel-Anzahl (tissue deposited number) und *TDm* – deponierte Partikel-Masse (tissue deposited mass), jeweils pro Fläche ( $\text{cm}^2$ ) und 4 h Expositionszeit; # – Anzahl; *et* – Region außerhalb des Thorax (Mund, Rachen, Hals; *tb* – Region der luftführenden Atemwege (Tracheo-Bronchial-Trakt); *al* – Gas-Austausch-Region (Alveolar-Trakt); *tl* – gesamte Lunge

lung region <i>r</i>	particle number	particle mass	coefficient of variation		<i>TD(r) / TD(tl)</i>	
	<i>TDn</i>	<i>TDm</i>	<i>TDn</i>	<i>TDm</i>	number	mass
	#/ $\text{cm}^2/4\text{h}$	$\text{ng}/\text{cm}^2/4\text{h}$	%	%	-fold	
<i>et</i>	1.62E+06 ± 1.21E+05	14 927 ± 1 403	± 7.46	± 9.40	3 460	4 326
<i>tb</i>	11 169 ± 687	72 ± 7	± 6.15	± 9.24	24	21
<i>al</i>	227 ± 14	1.4 ± 0.1	± 6.15	± 9.56	0.48	0.39
<i>tl</i>	469 ± 31	3.5 ± 0.3	± 6.66	± 9.27	1	1

#### 4.4.5 Modellierung der Zellexposition und theoretische Ansätze

Folgende Unterabschnitte zeigen die Simulations- und theoretischen Berechnungsergebnisse aus COMSOL und dem EXPOSITIONS-Modell.

##### 4.4.5.1 COMSOL Multiphysik Simulationen

Nach der Entwicklung einer geeigneten Geometrie für das ALI-Expositions-System wird das Geschwindigkeitsfeld unter der Annahme modelliert, dass der Zufluss gleich dem Abfluss ist. In Abbildung 32 ist das Geschwindigkeitsfeld für den Zu- und Abfluss von 100 [ml/min] dargestellt. Das Geschwindigkeitsfeld zeigt eine sehr geringe Geschwindigkeit über dem Boden des Zelleinsatzes, welche für die Zell-Exposition geeignet ist. Die Strömung wird auf dem Weg nach draußen beschleunigt und überquert den Rand der Trompete. Im nächsten Schritt werden die Partikel dem Strömungsgeschwindigkeitsfeld hinzugefügt.

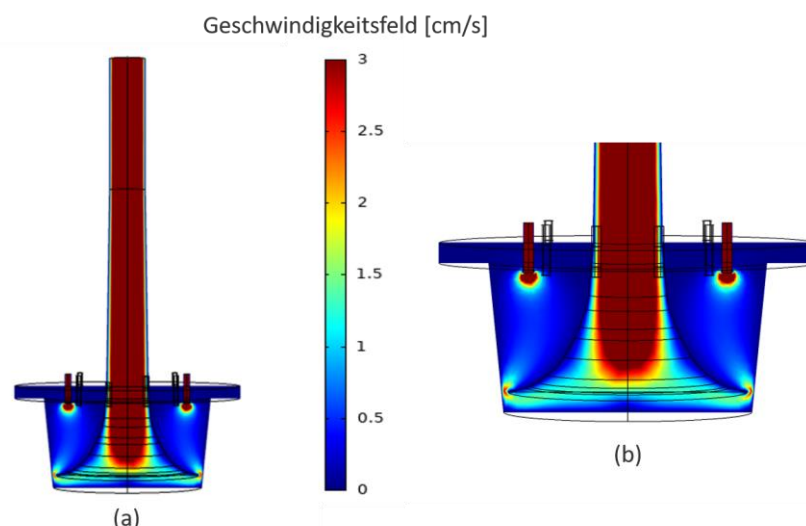


Abbildung 32: Das modellierte Geschwindigkeitsfeld [cm/s] im ALI-Expositions-System unter der Annahme eines Zu- und Abflusses von 100 [ml/min]. a) Das Geschwindigkeitsfeld in der gesamten Geometrie. b) Die vergrößerte Darstellung des Geschwindigkeitsfeldes im Zelleinsatz.

Bei einer Zell-Exposition ist es wichtig, eine homogene Verteilung der Partikel auf die Zellen zu haben. Daher haben wir eine Vielzahl von Tests durchgeführt, in welchen die Partikelgröße, die Partikelanzahlkonzentration und die



Durchflussrate variiert wurden. Die Ergebnisse für eine Gesamtzahl von 50.000 Partikeln mit einer Größe von 1  $\mu\text{m}$  und einer Flussrate von 100 [ml/min] sind in dieser Arbeit beispielhaft dargestellt. Um den Rechenprozess zu beschleunigen, wurde die Brownsche Bewegung für 1 $\mu\text{m}$  große Partikel ignoriert. Die Partikelverteilung am Boden des Zelleinsatzes ist in Abbildung 33 dargestellt. Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine höhere Konzentration an abgelagerten Partikeln am Rand des Zelleinsatzes. Um die Simulationsergebnisse mit der Realität vergleichen zu können, wurden im Labor mehrere Expositionen im ALI-System durchgeführt. Außerdem wurden mit Kollagen bedeckte runde Glasabdeckungen (Deckgläser) auf den Boden der Zelleinsätze gelegt und Polystyrol-Latex (PSL) - Partikel mit einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  exponiert. Anschließend wurde die Verteilung der PSL-Partikel auf den Glasabdeckungen mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Aufgrund der unzureichenden Bildqualität müssen die Experimente mit fluoreszierenden Partikeln wiederholt werden.

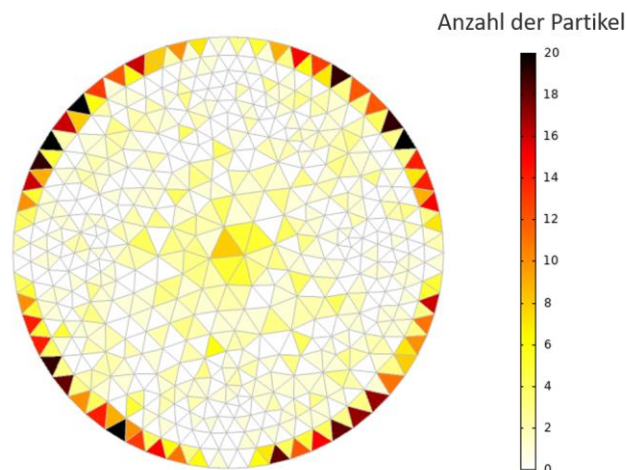


Abbildung 33: Verteilung der abgelagerten Partikel auf dem Boden eines Zell-Einsatzes im Expositionsteil des ALI Systems, modelliert mit Hilfe der COMSOL Software. Die Farb-Legende zeigt die Anzahl der Partikel.

#### 4.4.5.2 Theoretischer Ansatz für die Dosierungsberechnung (EXPOSITIONS-Modell)

Das in Abschnitt (3.4.5.2) erläuterte EXPOSITIONS-Modell kann als alternativer Ansatz zur Berechnung der Depositionseffizienz in einem Expositions-System wie dem ALI verwendet werden. Experimentelle Daten aus zwei verschiedenen Studien (Comouth et al., 2013; Fujitani et al., 2015) wurden herangezogen, um die Ergebnisse des EXPOSITIONS-Modells zu evaluieren. Die Hauptparameter der beiden Studien sind in Tabelle 9 aufgeführt. Aus den Übereinstimmungen zwischen den Modellergebnissen und den experimentellen Daten geht hervor, dass das EXPOSITIONS-Modell eine angemessene Methode ist und es daher zukünftig für Dosierungsberechnungen verwendet wird (Abbildung 34).

Tabelle 9: Die wichtigsten Parameter aus experimentellen Studien, verwendet zur Bewertung der Ergebnisse des EXPOSITIONS-Modells; mit  $h$  als Distanz zwischen Trompete und Expositionsplatte und  $r$  als den Radius der Depositionsplatte.

	Strömungsgeschwindigkeit [ml/min]	Temperatur [°C]	Partikeldichte [g/cm <sup>3</sup> ]	$h$ [mm]	$r$ [mm]
Comouth et al., 2013	100	37	2	2	12.2
Fujitani et al., 2015	7.8	24	1	1	5.5

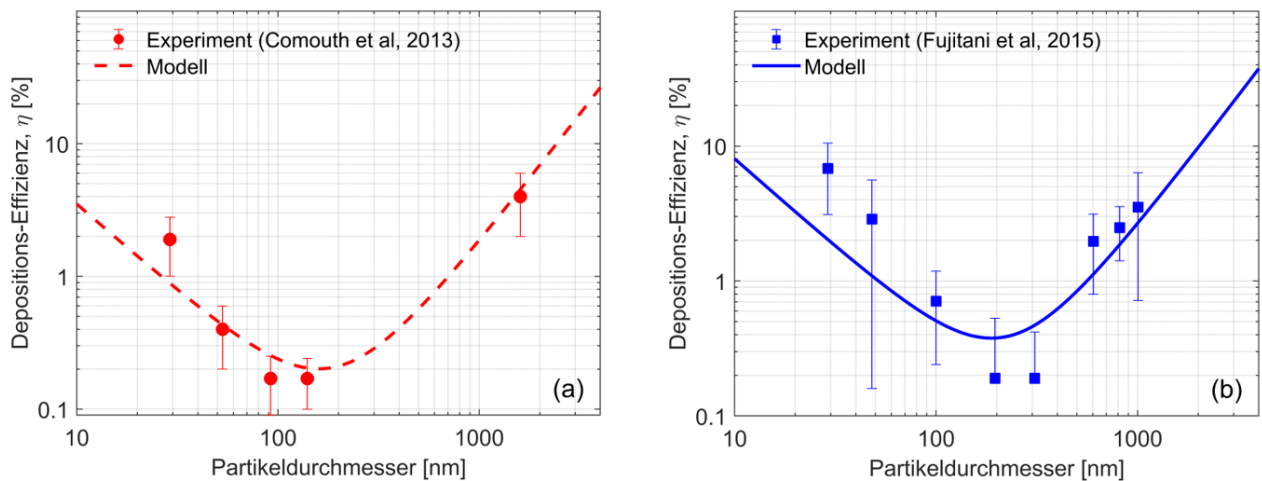


Abbildung 34: Vergleich der Ergebnisse des EXPOSITIONS-Modells mit den experimentellen Daten. a) Experimentelle Daten von (Comouth et al., 2013). b) Experimentelle Daten von (Fujitani et al., 2015).

#### 4.4.6 Berechnete und gemessene Deposition von DBP-Partikeln

Die theoretische Modellrechnung (EXPOSITIONS-Modell, Abschnitt 3.4.5.2) schätzt die im ALI-Expositionsmodul deponierte Dosis auf  $680 \pm 100 \text{ ng/cm}^2$  innerhalb eines 4-stündigen Experiments. Die von APS gemessenen Anzahlverteilungen, welche für die Schätzung verwendet wurden, sind in Abschnitt 3.3.2 (Abbildung 12) dargestellt. Die mit dem Modell berechnete Ablagerungseffizienz für DBP-Partikel ist in Abbildung 35 dargestellt.

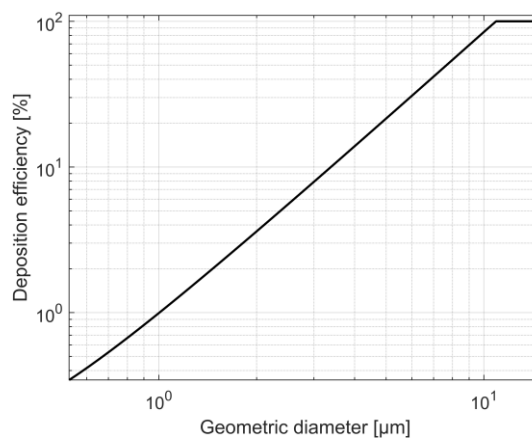


Abbildung 35: Ablagerungseffizienz von DBP-Partikeln in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser im EXPOSITIONS-Modell

Die Schätzung wurde mit der im LC-MS/MS-System gemessenen Dosis verglichen. Abbildung 36 zeigt, dass Gesamtaerosol (Partikel incl. Gasphase, AER) und reine Partikelphase (PP) ähnliche Dosiswerte für deponiertes DBP liefern, nämlich  $530 \pm 200 \text{ ng/cm}^2$  (AER) bzw.  $480 \pm 190 \text{ ng/cm}^2$  (PP). Gemessene und berechnete DBP-Partikeldosis liegen somit sehr nahe beieinander.

Wie in Abbildung 36 dargestellt, wurde keine Gasphasendeposition (GP) gemessen; der GP-Messwert war mit der unabhängigen Reinluft (iCA) vergleichbar. Eine der 6 Modul-Positionen im ALI-System wurde stets als „Reinluft-Position“ („cleaned air“, CA; Filter und Denuder in Serie) für Vergleichszwecke genutzt. Die dort gemessene hohe Deposition in Expo A und B (mittlere deponierte Dosis  $170 \pm 217 \text{ ng/cm}^2$ ) wird durch defekte Glasfaserfilter oder eine unzureichende Positionierung des Filters im Filterhalter erklärt. Da in der Filterposition kein DBP zu beobachten ist und Expo A und B am selben Tag mit unterschiedlichen Zellchargen durchgeführt wurden, ist diese Erklärung plausibel.

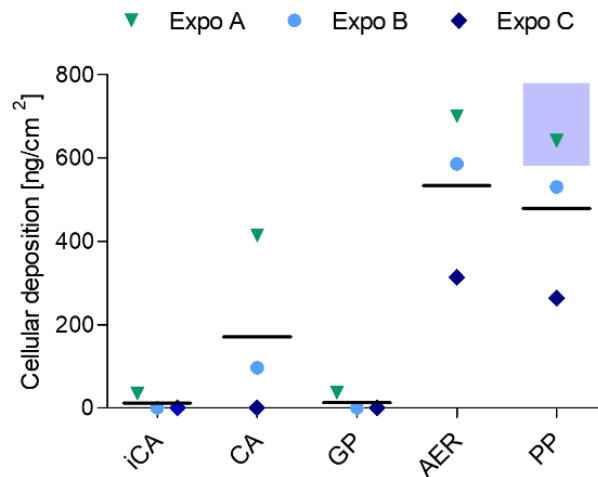


Abbildung 36: LC-MS/MS-Messungen von DBP aus drei unabhängigen Expositions-Experimenten (Expo A, B, C). In jedem Experiment wurden die Zellen mit je 5 verschiedenen SVOC-Phasen exponiert: iCA = unabhängige saubere Luft, CA = reine Luft (Filter und Denuder in Serie), GP = reine Gasphase (nur Filter), AER = Gesamt-Aerosol, PP = reine Partikelphase (nur Denuder). Der blau schraffierte Bereich repräsentiert das Ergebnis der Modellrechnung für die reine Partikelphase (PP).

## 5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

(Lucci et al., 2018) wurde ein theoretischer Ansatz zur Berechnung der deponierten Dosis im trompetenförmigen Einlass des Vitrocell Air Liquid Interface (ALI)-Systems vorgestellt. Wir haben ein Depositionsmodell erstellt, das auf der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Theorie basiert. Unser Modell wurde während der Laufzeit dieses Projekts in mehreren Veröffentlichungen verwendet (Offer et al., 2022; Ihantola et al., 2022; Pardo et al., 2022).

## 6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Dieses Projekt befasst sich mit halbflüchtigen organischen Verbindungen (SVOC). Diese Verbindungen können gleichzeitig in der Gas- und Partikelphase vorliegen. In diesem Projekt haben wir das Verhalten und die toxikologische Wirkung von Dibutylphthalat als Vertreter dieser Verbindungen untersucht.

### Modifizierung eines Aerosolgenerators

Mit einem Kondensations-Aerosolgenerator (Modell SLG 270, Fa. TOPAS, D) wurden verschiedene Aerosolarten erzeugt (z.B. Hexadecan, Tetradecan, Dibutylphthalat). Der Aerosolgenerator wurde so modifiziert, dass besonders große Partikel (1 bis 12  $\mu\text{m}$ ) erzeugt werden konnten. Das Verdunstungsverhalten von Tetradecan wurde im Labor gemessen und die Ergebnisse mit dem theoretischen Verdunstungsmodell verglichen, das in diesem und früheren Projekten entwickelt wurde. Das Modell zeigte – im Vergleich zu den Messungen – eine höhere Verdunstung, d. h. die Partikel im Modell schrumpften schneller als die realen. Dies führen wir darauf zurück, dass präzise Dampfdruckdaten bei niedrigen Temperaturen ( $<25\text{ }^\circ\text{C}$ ) fehlen, die Modellrechnung aber stark von ihnen abhängt.

Die Modifizierung des Aerosolgenerators zur Herstellung großer Partikel war erfolgreich. Der modifizierte Generator kann in Zukunft zur Herstellung eines breiten Spektrums von SVOC-Partikeln unterschiedlicher Zusammensetzung und Größe verwendet werden.

### **Neuer Denuder für körpergetragenen Probenehmer**

Körpergetragene Probenahmesysteme werden zum Bestimmen der Personendosis am Arbeitsplatz verwendet. Sie enthalten einen Filter zum Sammeln der Partikelphase und einen Denuder zur Adsorption der Gasphase. Im vorangegangenen Projekt wurde ein Holzkohle-Denuder charakterisiert und getestet, der leider heute nicht mehr am Markt erhältlich ist. Daher haben wir in diesem Projekt die Partikeltransmissionseffizienz und die Gasphasenadsorptionskapazität eines neuen Holzkohledenuders getestet. Zusätzlich wurde die Gasadsorptionskapazität des Denuders mit der modifizierten Gormley-Kennedy-Gleichung für röhrenförmige Denuder berechnet (Cheng, 2011).

Die Ergebnisse zeigen, dass

- der Denuder hinsichtlich der Durchlässigkeitseffizienz für kleine Partikel ( $< 0,3 \mu\text{m}$ ) bei Flüssen  $> 1 \text{ L/min}$  sehr gut geeignet ist
- die Durchlässigkeit für große Partikel ( $> 1 \mu\text{m}$ ) mit zunehmender Partikelgröße und Durchflussrate abnimmt. Daher sollte der Gasfluss bei großen Partikeln  $\leq 5 \text{ L/min}$  sein, um auch  $\text{PM}_{2,5}$  zuverlässig zu erfassen. Treten Partikel  $> 2,5 \mu\text{m}$  auf ( $\text{PM}_{10}$ ), muss der Probenahmestrom weiter auf  $1 \text{ L/min}$  reduziert werden.

Für die Probenahme am Arbeitsplatz wird ein Durchfluss von  $1 \text{ L/min}$  empfohlen, um gleichzeitig kleine und große Partikel zu erfassen.

Für die Prüfung der Gasadsorptionskapazität des neuen Denuders wurde Toluol gewählt da es aufgrund seines sehr hohen Dampfdrucks erlaubt, "Worst-Case-Szenario"-Schätzungen vorzunehmen. Die gemessene Gasadsorptionskapazität von Toluol ist im neuen Aktivkohledenuder extrem hoch, der gemessene Toluoldurchbruch nach 24 Stunden sehr gering ( $< 2\%$ ). Die gemessenen und berechneten Werte stimmen sehr gut überein. Daher wurde der Durchbruch auch für andere Verbindungen wie Dibutylphthalat (DBP) berechnet. DBP wurde später auch für die Zellexposition verwendet. Der neue Holzkohle-Denuder kann in den personengetragenen Probenehmern als Ersatz für den alten verwendet werden.

### **Das neue Zellexpositionssystem**

*In-vitro*-Zellexpositionssysteme werden häufig verwendet, um die toxikologische Wirkung verschiedener Aerosole auf Membranen menschlicher Lungenzellen zu untersuchen. Für unsere Studie haben wir ein neues Zellexpositionssystem konstruiert, das v.a. hinsichtlich toxischer Aerosole einfacher und sicherer zu betreiben ist als die herkömmlichen Klimakammern. Das neue System ist in einem geschlossenen Kühltisch aufgebaut. In ihm ist ein Expositionsmodul von VitroCell® mit allen Zusatzfunktionen für Partikel- und Luftbefeuchtung installiert. Das VitroCell-System ist mit Glasfaserfilter und dem neuen Aktivkohle-Denuder so ausgestattet, sodass die SVOC-Gas- und Partikelphase in 5 verschiedenen Modi untersucht werden konnten: externe Reinluft / Filter alleine / Denuder alleine / Filter+Denuder / weder Filter noch Denuder. Im neuen Zellexpositionssystem wurden erfolgreich Expositionen mit Dibutylphthalat durchgeführt.

Insbesondere wurde

- die Temperatur in der Klimakammer und unter den Zellen im Modul mit zwei Wasserbädern auf exakt  $37^\circ\text{C}$  geregelt und blieb während der Zellexposition konstant
- die Luftfeuchtigkeit mit einem neuen Befeuchtungssystem aus Glasrohr und Dialysemembran geregelt. Die Luftfeuchtigkeit lag in allen VitroCell-Positionen über  $90\%$
- das neue Expositionssystem wurde mit lebenden Zellen und Reinluft evaluiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das System statt für 2-4 stündige nun für bis zu 24-stündige Zellexpositionsexperimente geeignet ist

Um die potenziell unterschiedlichen Wirkungen der Gas- und Partikelphase von SVOCs zu bewerten, wurde ein neues In-vitro-ALI-Expositionssystem entwickelt. Während sich die meisten Studien bis jetzt auf Partikel-Toxizität fokussierten, gewinnt die Bedeutung der Berücksichtigung von SVOCs in der Gasphase für die Risikobewertung durch den hohen Anteil organischer Verbindungen in der Gasphase in der Atmosphäre mehr und mehr an Bedeutung. In diesem Zuge ermöglichte der neue Ansatz eine getrennte Exposition mit den jeweiligen SVOC-Aerosolphasen und eine gleichzeitige Bewertung der deponierten Dosis - mit kohärenten Depositionsergebnissen aus berechneten Schätzungen und empirischen Daten. Die genotoxische Untersuchung der Verbindung DBP ergab, dass die induzierten oxidativen DNA-Strangbrüchläsionen in menschlichen A549-Zellen möglicherweise auf partikelinduzierte Effekte und nicht auf die Gasphase zurückzuführen sind, und weist auf unterschiedliche Merkmale der Toxizitätsinduktion hin, die vom Aggregationszustand der SVOC abhängig sind. Da die Zellen über einen Expositionszeitraum von 24 h überleben und sich nicht ablösen, kann der Schluss gezogen werden, dass das System für Langzeitexpositionen geeignet ist. In diesem Rahmen könnten zukünftige Studien mit Langzeitexpositionen und die Verwendung von Zellmodellen, die für die menschlichen Atemwege repräsentativer sind, weiter dazu beitragen das Konzept der In-vitro-ALI-Exposition an realistischere Expositionsbedingungen anzupassen und somit entscheidend zum „3R-Ethos“ (replace, reduce, refine) zur Reduzierung von Tierversuchen beizutragen.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass das neue Expositionssystem verwendet werden kann, um die unterschiedlichen Auswirkungen der Gas- und Partikelphasentoxizität von Verbindungen mit höherer Flüchtigkeit zu untersuchen. Für diese Verbindungen wird die Gasphasenexposition im Hinblick auf die Inhalationstoxikologie relevanter sein. Daher sollten die Gasphasenkonzentration und der Dampfdruck einer bestimmten organischen Verbindung vor dem Experiment empirisch validiert werden, um eine Exposition gegenüber ähnlichen Massenkonzentrationen der Gas- und Partikelphase zu ermöglichen. Für die Modellevaluierung erweist sich DBP aufgrund seiner geringen Flüchtigkeit und des daraus resultierenden geringen Gasphasenanteils in den Experimenten nicht als optimale SVOC. Dennoch ermöglicht der modulare Aufbau des Systems die Auswahl verschiedener Arten von Aerosol-Emissionsquellen, die komplexere Emissionsquellen repräsentieren können.

### **Dosisabschätzung im neuen Zellexpositionssystem**

Die Expositions-Dosis ist der zentrale Parameter, um die toxikologische Wirkung einer bestimmten Substanz auf Lungenzellen zu interpretieren. Sie leitet sich aus der Anzahl oder Masse der Partikel ab, die auf einer bestimmten Fläche der Zellmembran (i.e. „auf einer Zelle“) abgeschieden wird. In diesem Projekt wurden drei verschiedene Methoden zur Abschätzung der deponierten Dosis getestet:

- Das CFD-Modul (Computational Fluid Dynamics) und das Partikelverfolgungsmodul der COMSOL Multiphysics®-Software wurden verwendet, um das Luftgeschwindigkeitsfeld und die Übertragungseffizienz von Partikeln im ALI-System zu simulieren.
- Ein Depositionsmodell wurde auf der Grundlage theoretischer Physik mit MATLAB entwickelt.
- Die deponierte Dosis des Ziel-SVOC (Dibutylphthalat) wurde mit dem Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) - System gemessen.

Die COMSOL Multiphysics® Software ist eine komplexe Software; sie benötigt die Geometrie des Systems als Basis, die entweder in COMSOL oder einer anderen 3D-Konstruktionssoftware (z.B. AutoCAD) entworfen werden kann. Die Ergebnisse der COMSOL-Modellrechnungen zeigen eine höhere Deposition als das theoretische Ablagerungsmodell. In COMSOL wurde eine höhere Deposition am äußeren Rand des Zell-Inserts beobachtet. In COMSOL führt die Erhöhung der Partikelanzahlkonzentration zu einem erheblichen Anstieg der Berechnungszeit und zu Einschränkungen bei der Simulation realer Konzentrationen.

Das Depositionsmodell basiert auf physikalischen Gesetzen und ist in MATLAB geschrieben. Die Modellrechnung zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit gemessenen Daten aus früheren Studien. Im vorliegenden Projekt wurde die mit MATLAB modellierte Dibutylphthalat-Dosis mit der gemessenen (LC-MS) verglichen und eine sehr gute

Übereinstimmung zwischen beiden festgestellt. Das MATLAB-Modell wurde in mehreren anderen Projekten und Publikationen unserer Abteilung verwendet. Da direkte Dosismessungen bei Zellexpositionen aufwändig und kompliziert sind, empfehlen wir, künftig das MATLAB-Depositionsmodell zu verwenden.

### Weitere Modellrechnungen

Für das Verdunstungsverhalten und Gleichgewicht von monodispersen Zwei-Stoff-Partikeln wurden numerische Modellrechnungen durchgeführt und Ergebnisse zu deren „Lebensdauer“ vorgestellt. Zusätzlich wurde auch eine exakte mathematische Lösung für das Problem gefunden (Dr. Obermaier, HMGU-Rechenzentrum). Ein Vergleich zwischen dieser exakten Lösung und der numerisch-berechneten bietet sich als Basis für eine Publikation in einem späteren Folgeprojekt an.

Die Modellrechnung zur Partikeldeposition im menschlichen Atemtrakt zeigt, dass unsere ALI-Zellexpositionen vor allem derjenigen Flächendosis nahekommen, welche am Gewebe der tracheo-bronchialen Region der menschlichen Lunge ankommt. Für den Gasaustauschbereich der Lunge (Alveolen) findet die Modellrechnung eine deutlich niedrigere Flächendosis. Diese kann in ALI-Experimenten durch geeignete weitere Verdünnung leicht erzielt werden. Unsere ALI-Experimente können daher hinsichtlich der modellierten Lungen-Dosis als „gesundheitsrelevant“ bezeichnet werden.

## 7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die Ergebnisse der biologischen Arbeitsgruppe werden in Form einer Dissertation vorgelegt; sie befindet sich gerade in der Abschlussphase. Seit Projektbeginn wurden mehrere Publikationen erstellt, einige sind noch in Vorbereitung oder wurden kürzlich eingereicht. Die wesentlichen Ergebnisse wurden auf internationalen Konferenzen vorgestellt und diskutiert. Anbei ist die Liste der projektbezogenen Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge:

Karg, E.W., Ferron, G.A., Bauer, S., Di Bucchianico, S and Zimmermann, R.: Is the particle deposition in a cell exposure facility comparable to the lungs? A computer model approach, *Aerosol Science & Technology*, 54:6, 668-684, 2020.

Binder, S., Cao, X., Bauer, S., Rastak, N., Kuhn, E., Dragan, G., Monsé, C., Ferron, G.A., Breuer, D., Öder, S., Karg, E.W., Sklorz, M., Di Bucchianico, S., Zimmermann, R.: In vitro genotoxicity of dibutyl phthalate on A549 lung cells at air-liquid interface in exposure concentrations relevant at workplaces. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1-12, 2021.

Binder, S., Rastak, N., Karg, E., Huber, A., Kuhn, E., Dragan, G.C., Monsé, C., Breuer, D., Di Bucchianico, S., Delaval, M., Oeder, S., Sklorz, M., Zimmermann, R.: Construction of an *in vitro* air-liquid interface exposure system to assess the toxicological impact of gas and particle phase of semi-volatile organic compounds, accepted in *Toxics*, November 2022.

Cao, X., Binder, S., Bauer, S., Huber, A., Öder, S., Lintelmann, J., Di Bucchianico, S., Zimmermann, R.: A comparative study of persistent DNA oxidation and chromosomal instability induced in vitro by oxidizers and reference airborne particles, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol 874–875, 2022.

### Das Depositionsmodell (EXPOSITIONS-Modell) wurde in der folgenden Veröffentlichung verwendet:

Offer, S., Hartner, E., Di Bucchianico, S., Bisig, C., Bauer, S., Pantzke, J., Zimmermann, E.J., Binder, S., Kuhn, E., Huber, A., Jeong, S., Käfer, U., Martens, P., Mesceriakovas, A., Bendl, J., Brejcha, R., Buchholz, A., Gat, D., Hohaus, T., Rastak, N., Jakobis, G., Kalberer, M., Kanashova, T., Hu, Y., Ogris, C., Marsico, A., Theis, F., Pardo, M., Gröger, T., Öder, S., Orasche, J., Paul, A., Ziehm, T., Zhang, Z.-H., Adam, T., Sippula, O., Sklorz, M., Schnelle-Kreis, J., Czech, H., Kiendler-Scharr, A., Rudich, Y., Zimmermann, R: Effect of Atmospheric Aging on Soot Particle Toxicity in Lung Cell Models at

the Air–Liquid Interface: Differential Toxicological Impacts of Biogenic and Anthropogenic Secondary Organic Aerosols (SOAs), *Environmental Health Perspectives*, Vol 130, 2022.

Ihantola, T., Hirvonen, M.R., Ihalainen, M., Hakkarainen, H., Sippula, O., Tissari, J., Bauer, S., Di Bucchianico, S., Rastak, N., Hartikainen, A., Leskinen, J., Yli-Pirilä, P., Miettinen, M., Suhonen, H., Rönkkö, T.J., Kortelainen, M., Lamberg, H., Czech, H., Martens, P., Orasche, J., Michalke, B., Jokiniemi, J., Zimmermann, R., Jalava, P.I.: Genotoxic and inflammatory effects of spruce and brown coal briquettes combustion aerosols on lung cells at the air-liquid interface, *Science of the Total Environment*, Vol 806, 2022.

Pardo, M., Offer, S., Hartner, E., Di Bucchianico, S., Bisig, C., Bauer, S., Pantzke, J., Zimmermann, E.J., Cao, X., Binder, S., Kuhn, E.,..., Zimmermann, R., Rudich, Y.: 2022. Exposure to naphthalene and  $\beta$ -pinene-derived secondary organic aerosol induced divergent changes in transcript levels of BEAS-2B cells. *Environment international*, 166, p.107366, 2022.

Bauer, S., Jalava, P., Di Bucchianico, S., Ihantola, T., Czech, H., Orasche, J., Hartikainen, A., Kanashova, T., Venancio, C., Joana, R., Uski, O., Rönkkö, T., Ihalainen, M., Irmeler, M., Beckers, J., Jakobi, G., Tiitta, P., Kaefer, U., Rastak, N., Karg, E., Prehn, C., Cecil, A., Kortelainen, M., Lamberg, H., Martikainen, M.V., Michalke, B., Oeder, S., Tissari, J., Hakkarainen, H., Abbaszade, G., Miersch, T., Jennerwein, M., Schnelle-Kreis, J., Kaoma, T., Buters, J., Dittmar, G., Yildirim, A.Ö., Jokiniemi, J., Hirvonen, M.R., Sippula, O., Zimmermann, R., Happonen, M.: *In vivo* and *in vitro* toxicity of emissions from a non-road diesel engine. (Manuscript).

## Konferenz-Beiträge:

Particle deposition in a cell exposure facility: Is it comparable to the lungs? A computer model approach. Karg, E.W., Ferron, G.A., Bauer, A., Di Bucchianico, S and Zimmermann, R., Presentation, *Asian Aerosol Conference (AAC)*, Univeristy of Hong Kong, China, 2019.

Ageing of Particles by Coagulation: Changes in Regional Lung Deposition. A Computer Model Approach. Karg, E.W., Ferron, G.A., Bauer, A., Di Bucchianico, S and Zimmermann, R., Presentation, *Asian Aerosol Conference (AAC)*, Univeristy of Hong Kong, China, 2019.

Why Detoxing All Combustion Engines? A Computer Model Approach to Regional Lung Deposition. Karg, E.W., Ferron, G.A., Bauer, A., Di Bucchianico, S and Zimmermann, R., Presentation, *ETH Conference on Combustion Generated Nanoparticles*, Zurich, Switzerland, 2019.

Emission Particulate Deposition at the Air-Liquid-Interface and in the Human Lungs – A Computer Model Approach. Karg, E.W., Ferron, G.A., Bauer, A., Di Bucchianico, S and Zimmermann, R., Presentation, *European Aerosol Conference (EAC)*, Gothenburg, Sweden, 2019.

An in vitro air-liquid interface model system to predict inhalation toxicity of semi-volatile environmental contaminants. Binder, S. et al, presentation, *European Aerosol Conference (EAC)*, Aachen, Germany, 31<sup>st</sup> August-4<sup>th</sup> September 2020.

Construction of a system to assess the toxicological impact of gas and particle phase of Dibutylphthalate on human lung cells. Binder, S., Rastak, N., Sklorz, M., Oeder, S., Zimmermann, R., *International Aerosol Conference (IAC)*, Athens, Greece, September 2022.

Lung Deposition of Inhaled Atmospheric Particles: The Influence of Particle Hygroscopicity. Erwin W. Karg, Anusmita Das, George A. Ferron, Ajit Ahlawat, A. K. Mandariya, G. Habib, Mira Poehlker, Alfred Wiedensohler and Ralf Zimmermann, oral presentation, *International Aerosol Conference (IAC)*, Athens, Greece, September 2022

Deposition of Inhaled Particles: The Influence of Particle Hygroscopicity. E.W. Karg, A. Das, R. Zimmermann and G.A. Ferron, poster presentation, *International Aerosol Conference (IAC)*, Athens, Greece, September 2022

## Hinweis

Die Abbildungen (12, 24, 25, 26, 35, 36) sind der nachstehenden Veröffentlichung entnommen (im Review-Prozess):

Binder, S., Rastak, N., Karg, E., Huber, A., Kuhn, E., Dragan, G.C., Monsé, C., Breuer, D., Di Bucchianico, S., Delaval, M., Oeder, S., Sklorz, M., Zimmermann, R.: Construction of an *in vitro* air-liquid interface exposure system to assess the toxicological impact of gas and particle phase of semi-volatile organic compounds, accepted in *Toxics*, November 2022.

## 8. Literatur

Binder, S., Cao, X., Bauer, S., Rastak, N., Kuhn, E., Dragan, G.C., Monsé, C., Ferron, G., Breuer, D., Oeder, S. and Karg, E., Sklorz, M., Di Bucchianico, S., Zimmermann, R.: In vitro genotoxicity of dibutyl phthalate on A549 lung cells at air-liquid interface in exposure concentrations relevant at workplaces. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 62(9), 490-501, 2021.

Calvert, G. M., Ward, E., Schnorr, T. M., and Fine, L. J.: to Metalworking Fluids : A Systematic Review, *Am. J. Ind. Med.*, 292, 282–292, 1998.

Cao, J.: Semi-Volatile Organic Compounds (SVOCs). In *Handbook of Indoor Air Quality* (pp. 1-29). Singapore: Springer Nature Singapore, 2022.

Cheng, Y.-S.: Instruments and Samplers Based on Diffusional Separation, in: *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications*, John Wiley and Sons, Inc., 365–379, 2011.

Cohen, H. and White, E.M., 2006. Metalworking fluid mist occupational exposure limits: a discussion of alternative methods. *Journal of occupational and environmental hygiene*, 3(9), pp.501-507.

Comouth, A., Saathoff, H., Naumann, K. H., Muelhopt, S., Paur, H. R., and Leisner, T.: Modelling and measurement of particle deposition for cell exposure at the air-liquid interface, *J. Aerosol Sci.*, 63, 103–114, <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2013.04.009>, 2013.

Ferron, G.A., Upadhyay, S., Zimmermann, R., Karg, E.: Model of the deposition of aerosol particles in the respiratory tract of the rat. II. Hygroscopic particle deposition. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 26(2):101-19, 2013.

Fischer, P., Hansen, K. and Breuer, D.: Measurement of biocides in metalworking fluids and in workplace air using capillary electrophoresis. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 18(4), pp.226-231, 2003.

Fuchs, N.A.: *Evaporation and droplet growth in gaseous media*". Pergamon Press, London (1959).

Fujitani, Y., Sugaya, Y., Hashiguchi, M., Furuyama, A., Hirano, S., and Takami, A.: Particle deposition efficiency at air-liquid interface of a cell exposure chamber, *J. Aerosol Sci.*, 81, 90–99, 2015.

Fuller, E.N., Ensley, K., Giddings, J.C.: Diffusion of halogenated hydrocarbons in helium. The effect of structure on collision cross sections, *The Journal of Physical Chemistry*, 73(11), pp. 3679-3685, 1969.

Fuller, E.N., Schettler, P.D., Giddings, J.C.: New method for prediction of binary gas-phase diffusion coefficients, *Industrial & Engineering Chemistry*, 58(5), pp. 18-27, 1966.

Gauthier, S.L., 2003. Metalworking fluids: oil mist and beyond. *Applied occupational and environmental hygiene*, 18(11), pp.818-824.

Gormley, P. G., and M. Kennedy.: Diffusion from a stream flowing through a cylindrical tube. In *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section A: Mathematical and Physical Sciences*, vol. 52, pp. 163-169. Royal Irish Academy, 1948.

Hickman, K. C. D., Hecker, J. C., and Embree, N. D.: Direct determination of low vapor pressures, *Ind. Eng. Chem. - Anal. Ed.*, 9, 264–267, <https://doi.org/10.1021/ac50110a005>, 1937.



Ihantola, T., Hirvonen, M.R., Ihalainen, M., Hakkarainen, H., Sippula, O., Tissari, J., Bauer, S., Di Bucchianico, S., Rastak, N., Hartikainen, A., Leskinen, J., Yli-Pirilä, P., Miettinen, M., Suhonen, H., Rönkkö, T.J., Kortelainen, M., Lamberg, H., Czech, H., Martens, P., Orasche, J., Michalke, B., Jokiniemi, J., Zimmermann, R., Jalava, P.I.: Genotoxic and inflammatory effects of spruce and brown coal briquettes combustion aerosols on lung cells at the air-liquid interface, *Science of the Total Environment*, Vol 806, 2022.

Karg, E.W., Ferron, G.A., Bauer, S., Di Bucchianico, S., Zimmermann, R.: Is the particle deposition in a cell exposure facility comparable to the lungs? A computer model approach. *Aerosol Science and Technology* 54(6):668-684, 2020.

Kohlmeier, V., Dragan, G. C., Orasche, J., Schnelle-Kreis, J., Breuer, D., and Zimmermann, R.: Carbonaceous monolithic multi-channel denuders as vapour-particle partitioning tools for the occupational sampling of semi-volatile organic compounds, *Ann. Work Expo. Heal.*, 62, 899–903, 2018.

Kohlmeier, V., Dragan, G.C., Orasche, J., Schnelle-Kreis, J., Breuer, D., Zimmermann, R.: Monolithische kohlenstoffhaltige Denuder als Erweiterung der personengetragenen GGP-Sammler zur Probenahme luftgetragener Dampf/Partikel-Gemische. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 79, 47-54, 2019.

Lillienberg, L., Burdorf, A., Mathiasson, L., and Thörneby, L.: Exposure to metalworking fluid aerosols and determinants of exposure, *Ann. Occup. Hyg.*, 52, 597–605, <https://doi.org/10.1093/annhyg/men043>, 2008.

Linder, E., J.: Vapor pressures of some hydrocarbons, *Phys. Chem.*35, 531, 1931.

Lucci, F., Castro, N.D., Rostami, A.A., Oldham, M.J., Hoeng, J., Pithawalla, Y.B., Kuczaj, A. K.: Characterisation and modeling of aerosol deposition in Vitrocell® exposure systems - exposure well chamber deposition efficiency. *J. Aerosol Sci.* 123, 141–160, 2018.

Offer, S., Hartner, E., Di Bucchianico, S., Bisig, C., Bauer, S., Pantzke, J., Zimmermann, E.J., Binder, S., Kuhn, E., Huber, A., Jeong, S., Käfer, U., Martens, P., Mesceriakovas, A., Bendl, J., Brejcha, R., Buchholz, A., Gat, D., Hohaus, T., Rastak, N., Jakobis, G., Kalberer, M., Kanashova, T., Hu, Y., Ogris, C., Marsico, A., Theis, F., Pardo, M., Gröger, T., Öder, S., Orasche, J., Paul, A., Ziehm, T., Zhang, Z.-H., Adam, T., Sippula, O., Sklorz, M., Schnelle-Kreis, J., Czech, H., Kiendler-Scharr, A., Rudich, Y., Zimmermann, R: Effect of Atmospheric Aging on Soot Particle Toxicity in Lung Cell Models at the Air–Liquid Interface: Differential Toxicological Impacts of Biogenic and Anthropogenic Secondary Organic Aerosols (SOAs), *Environmental Health Perspectives*, Vol 130, 2022.

Pardo, M., Offer, S., Hartner, E., Di Bucchianico, S., Bisig, C., Bauer, S., Pantzke, J., Zimmermann, E.J., Cao, X., Binder, S., Kuhn, E.,..., Zimmermann, R., Rudich, Y.: 2022. Exposure to naphthalene and  $\beta$ -pinene-derived secondary organic aerosol induced divergent changes in transcript levels of BEAS-2B cells. *Environment international*, 166, p.107366, 2022.

Possanzini, M., Febo, A., and Liberti, A.: New design of a high-performance denuder for the sampling of atmospheric pollutants, *Atmos. Environ.*, 17, 2605–2610, [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(83\)90089-6](https://doi.org/10.1016/0004-6981(83)90089-6), 1983.

Robins, T., Seixas, N., Franzblau, A., Abrams, L., Minick, S., Burge, H., and Schork, M. A.: Acute respiratory effects on workers exposed to metalworking fluid aerosols in an automotive transmission plant, *Am. J. Ind. Med.*, 31, 510–524, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0274\(199705\)31:5<510::AID-AJIM4>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0274(199705)31:5<510::AID-AJIM4>3.0.CO;2-X), 1997.

Verhoek, F. H. and Marshall, A. L.: Vapor Pressures and Accommodation Coefficients of Four Non-Volatile Compounds. The Vapor Pressure of Tri-m-Cresyl Phosphate Over Polyvinyl Chloride Plastics, *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 2737–2742, <https://doi.org/10.1021/ja01265a053>, 1939.

Viton, C., Chavret, M., Behar, E., Jose, J.: Vapor pressure of normal alkanes from decane to icosane at temperatures from 244 K to 469 K and pressures from 0.4 pa to 164 KPa, *J.Int. Electron. J. Phys.-Chem. Data*, 2, 215-224, 1996.

## Appendix: Das Gleichgewicht für die Verdunstung von Teilchen, bestehend aus Zwei-Komponenten

(In Zusammenarbeit mit Dr. J. Obermaier des HMGU-Rechenzentrums)

Das Gleichgewicht wird bestimmt durch die Gesamte Massen-Konzentration die beiden Komponenten:

$$m_{t,1} = N_p m_{p,1}(0) + c_1(0) = N_p m_{p,1}(\infty) + c_1(\infty) = \frac{N_p}{M_1} M_1 m_{p,1}(\infty) + \frac{\frac{m_{p,1}}{M_1}}{\frac{m_{p,1}}{M_1} + \frac{m_{p,2}}{M_2}} c_{sat,1} \quad (A1.1A)$$

und

$$m_{t,2} = N_p m_{p,2}(0) + c_2(0) = N_p m_{p,2}(\infty) + c_2(\infty) = \frac{N_p}{M_2} M_2 m_{p,2}(\infty) + \frac{\frac{m_{p,2}}{M_2}}{\frac{m_{p,1}}{M_1} + \frac{m_{p,2}}{M_2}} c_{sat,2} \quad (A1.1B)$$

Die Interaktion der Beide Stoffen an der Teilchenoberfläche ist:

$$R_1(\infty) = \frac{c_1(\infty)}{c_{sat,1}} = \frac{n_1}{n_1+n_2} = \frac{\frac{m_{p,1}}{M_1}}{\frac{m_{p,1}}{M_1} + \frac{m_{p,2}}{M_2}} \quad (A1.2A)$$

und

$$R_2(\infty) = \frac{c_2(\infty)}{c_{sat,2}} = \frac{n_2}{n_1+n_2} = \frac{\frac{m_{p,2}}{M_2}}{\frac{m_{p,1}}{M_1} + \frac{m_{p,2}}{M_2}} \quad (A1.2B)$$

mit

$c_i(t)$  - Dampfkonzentration der Komponente  $i$  in Luft zur Zeit  $t$ ,

$c_{sat,i}$  - gesättigte Dampfkonzentration der Komponente  $i$ ,

$n_i$  - Mol der Komponente  $i$  im Teilchen,

$M_i$  - Molekulargewicht der Komponente  $i$ ,

$m_{p,i}(t)$  - Masse in Teilchen der Komponente  $i$  zur Zeit  $t$ ,

$m_{t,i}$  - Gesamtgewicht s-Konzentration der Komponente  $i$  in die Teilchen und in der Luft,

$N_p$  - Teilchenkonzentration,

$n_i$  - Mol im einem Teilchen der Komponente  $i$ ,

$R_i$  - Faktor von Raoult der Komponente  $i$ ,

$t$  - Zeit.

Die Gleichungen (A2.1, A2.2) werden vereinfacht mit:

$$x = \frac{m_{p,1}}{M_1} \quad (A1.3A)$$

$$y = \frac{m_{p,2}}{M_2} \quad (A1.3B)$$

$$a = m_{t,1} = N_p m_{p,1}(0) + c_1(0) \quad (A1.3C)$$

$$b = m_{t,2} = N_p m_{p,2}(0) + c_2(0) \quad (A1.3D)$$

$$c = N_p M_{p,1} \quad (A1.3E)$$

$$d = N_p M_{p,2} \quad (A1.3F)$$

$$e = c_{sat,1} \quad (A1.3G)$$

$$f = c_{sat,2} \quad (A1.3H)$$

Die Gleichungen (A1.1) und (A1.2) werden

$$a = cx + e \frac{x}{x+y} \quad (A1.4A)$$

and

$$b = dy + f \frac{y}{x+y} \quad (A1.4B)$$

Der Befehl in Mathematica ist:

$$\text{Solve}[a == c x + e x / (x + y) \ \&\& \ b == d y + f y / (x + y), \{x,y\}]. \quad (A1.5)$$

Es gibt zwei Lösungen:

$$\begin{aligned}
 x_1 &= (e (b c + a d) + (2 a - e) (c f - d e) - e \text{Sqrt}[4 a b c d + (b c - c f + d e - a d)^2]) / (2 c (c f - d e)), \\
 y_1 &= (f (a d + b c) + (2 b - f) (d e - c f) - f \text{Sqrt}[4 a b c d + (b c - c f + d e - a d)^2]) / (2 d (d e - c f)).
 \end{aligned}
 \tag{A1.6A}$$

und

$$\begin{aligned}
 x_2 &= (e (b c + a d) + (2 a - e) (c f - d e) + e \text{Sqrt}[4 a b c d + (b c - c f + d e - a d)^2]) / (2 c (c f - d e)), \\
 y_2 &= (f (a d + b c) + (2 b - f) (d e - c f) + f \text{Sqrt}[4 a b c d + (b c - c f + d e - a d)^2]) / (2 d (d e - c f)).
 \end{aligned}
 \tag{A1.6B}$$

Nur eine Lösung mit Werten mit sowohl x als auch y größer als 0 ist physikalisch realistisch.