

DIN EN ISO 4484-2



ICS 13.020.40; 59.080.01

Einsprüche bis 2021-08-04

Entwurf

**Textilien und textile Erzeugnisse –
Mikroplastik aus textilen Quellen –
Teil 2: Qualitative und quantitative Bewertung von Mikroplastik
(ISO/DIS 4484-2:2021);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 4484-2:2021**

Textiles and textile products –
Microplastics from textile sources –
Part 2: Qualitative and quantitative evaluation of microplastics (ISO/DIS 4484-2:2021);
German and English version prEN ISO 4484-2:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-06-04 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nmp@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP), 10772 Berlin oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 141 Seiten

DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 4484-2:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 248 „Textilien und textile Erzeugnisse“ erarbeitet, dessen Sekretariat von BSI (Vereinigtes Königreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 062-05-13 AA „Textilpflege, Wassereinwirkung, Knitterverhalten“ im DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 7888:1985	siehe	DIN 38404-8:1985-09
ISO 15705:2002	siehe	DIN ISO 15705:2003-01

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN 38404-8:1985-09, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C); Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit (C 8)*

DIN ISO 15705:2003-01, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (ST-CSB) — Küvettestest (ISO 15705:2002)*

Titel de: Textilien und textile Erzeugnisse — Mikroplastik aus textilen Quellen —
Teil 2: Qualitative und quantitative Bewertung von Mikroplastik
(ISO/DIS 4484-2:2021)

Titel en: Textiles and textile products — Microplastics from textile sources — Part 2:
Qualitative and quantitative evaluation of microplastics
(ISO/DIS 4484-2:2021)

Titel fr:

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung des Verfahrens und Anwendbarkeit auf unterschiedliche Matrices	9
4.1 Allgemeine Informationen	9
4.2 Anwendung der Analyseergebnisse	10
4.3 Anwendungsgebiete und Anwendungsbeschränkungen	10
5 Materialien, Reagenzien, Geräte und Ausrüstung	11
5.1 Grundsätze und Verfahren zur Verringerung der Umgebungsbelastung	11
5.1.1 Verfahren zur Verringerung von Verunreinigungen	11
5.2 Reagenzien	11
5.2.1 15%ige Wasserstoffperoxidlösung	11
5.2.2 Natriumhypochlorit (1 M)	12
5.2.3 Waschlösungen	12
5.3 Glasgeräte und Ausrüstungen	12
5.3.1 Waschen der Glasgeräte, Ausrüstungen und Filtersysteme	13
5.3.2 Mikro-FTIR	13
5.3.3 Mikro-Raman	13
5.3.4 Lichtmikroskopie	14
5.3.5 Sonstige Laborgeräte	14
5.4 Filter	14
5.4.1 Mikro-FTIR-Filter	14
5.4.2 Mikro-Raman-Filter	15
5.4.3 Ablesen der Filter	15
5.4.4 Verunreinigungen und Reinigungsprozess	16
6 Herstellung von Standardproben	16
6.1 Herstellung von (faserförmigen) Mikroplastik-Standardproben	16
6.2 Herstellung von Standardproben (wasserbasiert)	19
6.3 Filtration der Standardfaser (wasserbasiert)	20
6.3.1 Filtrationsprozess	20
6.4 Qualitätskontrolle der Standardprobe und der Durchführung	21
6.5 Mikroplastikzählung mit Lichtmikroskop oder Mikro-FTIR bzw. Mikro-Raman	23
6.5.1 Untersuchung mit dem Mikroskop	23
6.5.2 Ablesung des Filters	23
6.5.3 Verunreinigungen	24
6.5.4 Zählung der Mikroplastik	24
6.5.5 Zählung der Mikroplastik mit Mikro-FTIR	24
6.5.6 Zählung der Mikroplastik mit Mikro-Raman	26
7 Probenvorbereitung	28
7.1 Feste Matrix (Faser, Textilgewebe oder Derivate)	28
7.2 Flüssige Matrix (wässrig)	28
7.2.1 Festlegung von Volumen/Masse der zu filtrierenden Probe und Anzahl der Filter	28

7.3	Luftmatrizes	29
7.4	Voruntersuchungen.....	29
7.5	Leitfähigkeit	30
7.6	CSB	30
7.7	Vorbehandlung.....	30
7.8	Säurebehandlung (Waschen) (Salzentfernung).....	30
7.9	Oxidation (Entfernen von organischen Substanzen)	31
7.10	Volumen der H ₂ O ₂ -Lösung	31
7.10.1	Reaktionszeit	31
7.11	Homogenisierung/Hydratation und/oder Ultraschallbehandlung der Probe	32
7.12	Vorverdünnung.....	32
8	Analyseverfahren	33
8.1	Voruntersuchung.....	33
8.2	Zugabe des internen Standards.....	33
8.3	Filtrieren.....	33
8.4	Rückgewinnungsverfahren und letzter Waschvorgang.....	33
8.5	Bildanalyse	34
8.6	Molekülspektroskopie (Schwingungsspektroskopie).....	34
8.6.1	Festlegung der Gerätevoraussetzungen.....	34
8.6.2	Nachweisgrenzen	35
8.6.3	Berechnung der signifikanten Anzahl an Mikropartikeln für die Analyse	35
8.6.4	Gerätevoraussetzungen für Mikro-FTIR: Identifizierung des Mikroplastiks.....	36
8.6.5	Gerätevoraussetzungen für Mikro-Raman: Identifizierung des Mikroplastiks	37
8.6.6	Vergleichen von Spektren und Identifizierung des Mikroplastiks	38
8.6.7	Abschätzung der Außenfläche und des Volumens	39
8.6.8	Berechnung der Gesamtfläche und Gesamtmasse	39
8.6.9	Berechnung der Rückgewinnungsrate (Rr) für die ZÄHLUNG.....	40
9	Prüfbericht.....	41
9.1	Beispiel für einen Prüfbericht für Mikroplastik	41
10	Ökotoxikologischer Aspekt.....	43
10.1	Einleitung	43
10.2	Ziel und Kurzbeschreibung des Verfahrens	44
10.3	Vorausgehende Schritte.....	44
10.3.1	Probenahme	44
10.3.2	Probenkonservierung.....	45
10.3.3	Trennung von Mikroplastik.....	45
10.3.4	Filtrieren.....	45
10.3.5	Vorbereiten der Lösung für die Mikroplastik-Rückgewinnung/Exposition	45
10.4	Apikales Bioassay.....	45
10.4.1	Reproduktionstest an <i>Daphnia magna</i> (OECD-Guideline Nr. 211)	46
10.5	Biomarker-Reihe	47
10.5.1	Messbare Endpunkte auf verschiedenen biologischen Ebenen.....	48
10.5.2	Kritische Punkte	52
10.6	Statistischer Ansatz und Integration von Biomarkern.....	53
10.6.1	Empfehlungen.....	55
Anhang A (informativ)		56
A.1	Biomarker	56
A.2	Anleitungen zur Berechnung des BAI	56
Anhang B (informativ)	Mikrotom für die Standardprobenherstellung	60
Anhang C (informativ)		61
C.1	Beispiele für die Ausarbeitung von Statistiken.....	61
Anhang D (informativ)		66

D.1	Thermoanalytische Verfahren.....	66
D.2	TED-GC/MS.....	66
D.3	Behälter mit Proben (TED-GC/MS)	66
D.4	Referenzmaterialien für die TED-GC/MS.....	67
D.5	Analyseverfahren mithilfe von TED-GC/MS (zusätzlicher Abschnitt vor dem Abschnitt „Prüfbericht“).....	67
D.5.1	Sterilisation, Trocknung, Homogenisierung	67
D.5.2	Spezifische Identifizierung.....	68
D.5.3	Quantitative Bestimmung des Signals	69
D.5.4	Nachweisgrenze	69
D.5.5	Qualitätskontrolle	70
D.5.6	Beispiele für Prüfberichte für Mikroplastik.....	70
	Literaturhinweise.....	71

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 4484-2:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 248 „Textilien und textile Erzeugnisse“ erarbeitet, dessen Sekretariat von BSI gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN XXXX:XXXX ersetzen.

Im Vergleich zur Vorgängerausgabe wurden die folgenden technischen Änderungen vorgenommen:

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinien siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

[ANMERKUNG für den Verfasser: Gegebenenfalls Angaben zu verwandten Dokumenten oder anderen Teilen einer Normenreihe ergänzen. Eine Auflistung aller Teile einer Normenreihe kann auf der CEN-Internetseite abgerufen werden.]

Einleitung

Da Mikroplastik ein Problem für die Umwelt darstellt, sind dessen Menge, Form und Größe ausschlaggebende Parameter für die Bewertung seiner Auswirkungen und die Erarbeitung einer Zähltechnik ist demzufolge der einzig logische Ansatz. Darüber hinaus sind nicht alle analysierten Mikropartikel synthetischen Ursprungs; diese gilt es zu identifizieren und von Mikroplastik zu differenzieren.

Das Verfahren ist so ausgelegt, dass die Art, die numerische Konzentration, die Oberfläche und die (geschätzte) Masse von Mikroplastik, das in der Textilbranche produziert bzw. freigesetzt und in einer festen, wässrigen oder gasförmigen Matrix gesammelt wird, ermittelt werden.

In Abhängigkeit von der Matrix kann eine Vorbehandlung der Probe notwendig sein, um die erforderliche Konzentration von Mikroplastik zu erzielen und anorganische sowie organische (z. B. biologischen Ursprungs) Verunreinigungen zu beseitigen, welche die Identifizierung behindern können. Das Verfahren besteht aus einer Voruntersuchung der Probe mit einem Lichtmikroskop und der anschließenden Identifizierung des Mikroplastiks durch Molekülspektroskopie. Das Verfahren bietet die Möglichkeit, zwei verschiedene Techniken der Molekülspektroskopie anzuwenden, d. h. Mikro-FTIR und Mikro-Raman, um Plastikpartikel kleiner als ein Mikrometer zu identifizieren und zu zählen.

Das Verfahren ist so ausgelegt, dass eine Neubewertung der Zählwerte von Mikroplastik möglich ist, wenn Hinweise auf toxikologische Wirkungen und Umweltauswirkungen vorliegen.

Diese Norm beschreibt das Analyseverfahren für einen Einfachfilter. Unsicherheiten bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Mikroplastik, die auf vorhandene Verunreinigungen oder auf die Variabilität zwischen verschiedenen Filtern zurückzuführen sein können, bedeuten jedoch, dass Wiederholungen durchgeführt werden müssen, um Genauigkeit und Präzision zu ermitteln.

Dieses Verfahren liefert nützliche Informationen für die ausführliche Bewertung der Auswirkungen verschiedener Polymere auf die Gesundheit und die Umwelt.

Es ist bekannt, dass Mikroplastik aufgrund seiner Lipophilie Transportmittel für toxische Verbindungen sein kann (wie z. B. PCBs, PAHs, Dioxine) oder Transportmittel für pathogene Mikroorganismen, die an seiner Oberfläche haften und (mit ihrer Toxizitätsdosis) assimiliert werden können und in Organismen und Zellen eindringen können.

Zur Mikroplastikfamilie gehören Partikel auf synthetischer Basis, wie Polypropylen, Polystyren, Polyamid, Polyethylenterephthalat, Polyvinylchlorid, Polyacrylnitril, Polymethylacrylat, Elastomere und Silikonkautschuk, mit einer Größe unter 5 mm (15 mm, wenn faserförmig).

Der Ursprung von Mikroplastik ist vielfältig. Seine Form und Größe ebenso. Wird es aus Textilien herausgelöst, ist die typische (aber nicht die einzige) Morphologie faserförmig und sein Durchmesser und seine Länge können je nach den Aufbauparametern von Garnen und Geweben oder den Waschbedingungen variieren.

1 Anwendungsbereich

Dieses Verfahren gilt für die Bestimmung von Mikroplastik (in der Textilbranche), das sich in verschiedenen Matrices (z. B. Abwasser aus der Textilverarbeitung, Kleiderwaschwasser, Luftemissionen aus der Textilverarbeitung, Feststoffabfälle aus der Textilverarbeitung usw.) angesammelt hat.

Das Verfahren ermöglicht eine qualitativ-quantitative analytische Bestimmung des Mikroplastiks, bei der Folgendes definiert werden kann:

- die Anzahl;
- die Morphologie (die morphologischen Eigenschaften);
- die Größenverteilung;
- die Art, der chemische Ursprung oder die Eigenschaften der Polymere sowie ihre Farbe, falls vorhanden.

Mit dem Verfahren können auch die Ergebnisse bezüglich der geschätzten Oberfläche und Masse von Mikroplastik je Probeneinheit angegeben werden.

Die Ergebnisse der Quantifizierungen von Mikroplastik können mithilfe des Verfahrens eindeutig angegeben werden, und zwar mit einer Maßeinheit, die nicht von der Herkunft der untersuchten Probe abhängt (Rohmaterial, Herstellungsprozess, Umweltprobe (Abwasser, z. B. vom Wäschewaschen, Luft, industrielles Prozesswasser usw.)).

Das Verfahren ermöglicht die Bestimmung von Matrices unterschiedlicher Aggregatzustände (z. B. fest, flüssig oder gasförmig) an Proben aus dem Textilbereich:

- feste Proben aus dem Prozess der Textilherstellung;
- Wasserproben aus dem Prozess der Textilherstellung und/oder vom Wäschewaschen;
- Luftproben zur Prüfung der Luftqualität am Arbeitsplatz von Textilherstellungsbetrieben.

Das Verfahren, mit dem Informationen wie Größe, Form, Oberfläche und (geschätzte) Masse gesammelt werden können, ermöglicht die Weitergabe von Informationen an Spezialisten für die ökotoxikologische Bewertung.

Alternativ zur Bestimmung aller oben genannten Parameter besteht die Möglichkeit, auf einfachere Weise nur die Masse jedes in der Probe vorhandenen Polymers mithilfe der in Anhang D beschriebenen thermoanalytischen Verfahren zu bestimmen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

Verordnung (EU) Nr. 1007/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. September 2011 über die Bezeichnungen von Textilfasern und die damit zusammenhängende Etikettierung und Kennzeichnung der Faserzusammensetzung von Textilerzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinie 73/44/EWG des Rates und der Richtlinien 96/73/EG und 2008/121/EG des Europäischen Parlaments und des Rates (Text von Bedeutung für den EWR).

Staubanalyse in der Arbeitsumgebung

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1 Mikroplastik MP

Material, das aus einem festen Polymer besteht, das Partikel enthält, denen Additive oder andere Substanzen zugesetzt worden sein können, und bei dem ≥ 1 % Massenanteil an Partikeln Folgendes aufweisen:

- (i) alle Abmessungen $1 \text{ nm} \leq x \leq 5 \text{ mm}$;
- (ii) bei Fasern: eine Länge von $3 \text{ nm} \leq x \leq 15 \text{ mm}$ und ein Längen/Durchmesser-Verhältnis von > 3 ;

Polymere, die in der Natur vorkommen und chemisch nicht verändert wurden (außer durch Hydrolyse), sind hiervon ausgenommen, da es sich dabei um (biologisch) abbaubare Polymere handelt

[QUELLE: ECHA — ANNEX XV Restriction Report — Microplastics, 22 August 2019, Absatz 1.2.2.1]

3.2 signifikante Probenmenge

Volumen, das in Abhängigkeit von Qualität (Gehalt an suspendierten Feststoffen (TSS, en: total suspended solids), chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)) und Herkunft der Probe filtriert wurde; siehe 7.2

3.3 Teilprobe

ein Aliquot (eine Teilmenge) der Primärprobe, verdünnt (soweit bekannt) mit entmineralisiertem Wasser; siehe 7.13

3.4 Waschlösung

Lösung zum Waschen der Ausrüstung, um sämtliche Mikroplastikrückstände zu entfernen

3.5

Bildanalyse

Identifizierung und Klassifizierung von Partikeln/Fasern nach ihrer Morphologie und Größe, woraus sich zusätzliche Informationen über die Probe ergeben, wie: prozentuale Verteilung, Anzahl und Größe der Mikropartikel und Mikropartikel mit Faserform

3.6

Molekülspektroskopie

Schwingungsspektroskopie

Analyse (FTIR oder Raman) in Verbindung mit Lichtmikroskopie für:

- die Identifizierung des Polymerbestandteils des Partikels;
- die Neuklassifizierung der Partikel entsprechend dem Polymer, aus dem sie bestehen, nachdem sie durch die Bildanalyse erfasst wurden, und die Sammlung von Informationen über das identifizierte Mikroplastik wie Verteilung, prozentualer Anteil, Anzahl und Größe

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens und Anwendbarkeit auf unterschiedliche Matrices

4.1 Allgemeine Informationen

Um das Mikroplastik in einer Matrix bestimmen zu können, ist es zunächst notwendig, einen aussagekräftigen Teil davon auf ein geeignetes Filter aufzutragen, um die anschließende mikroskopische Mengenanalyse durchführen zu können (Molekülspektroskopie und optische Spektroskopie/Bildspektroskopie).

Um mit der Anwendung des Verfahrens fortzufahren, sind demnach je nach physikalischem Zustand der Ausgangsmatrix drei verschiedene Ansätze zu verfolgen:

- ein pulverförmiger Feststoff oder eine Verbindung von mehreren Feststoffen;
- eine wässrige (flüssige) Lösung;
- ein Gas.

Bei **festen Proben**, sofern sie pulverförmig sind, wird die vorläufige Dispergierung eines repräsentativen Aliquots der Proben in einem bekannten Volumen entmineralisierten Wassers oder einer Dispergierlösung bestehend aus einem Tensid in entmineralisiertem und filtriertem Wasser durchgeführt. Handelt es sich bei der Probe um einen Feststoff, der nicht in Pulverform vorliegt, ist zunächst eine geeignete Vorbehandlung für dessen Zerlegung vorzunehmen (z. B. mithilfe von Ultraschall und/oder Säure-/Basen-/Oxidationsaufschluss).

Filtrieren einer Suspension, die mindestens 5 mg der Probe enthält, mit einem Filter aus geeignetem Material, geeigneter Porengröße und geeigneter Form (abhängig von der angewendeten spektralanalytischen Technik).

Analyse des Materials auf dem Filter entsprechend der folgenden Beschreibung.

Feststellen der Zusammensetzung des Mikroplastiks durch Mikro-FTIR-/Mikro-Raman-Spektroskopie und Bestimmen seiner Maße durch Bildanalyse.

Berechnen der Gesamtmasse des auf dem Filter vorhandenen Mikroplastiks basierend auf der Fläche der Probenablagerung, dem untersuchten Oberflächenanteil des Filters, der Anzahl und Größe der untersuchten Partikel und Fasern.

Bei der Analyse von **wässrigen Flüssigkeiten** werden eine Vorfiltrierung und die damit verbundenen Reinigungs-, Wasch- und Abscheideprozesse auf geeigneten Filtern aus Celluloseester mit einer Porengröße von 0,45 Mikrometer durchgeführt.

Das Mikroplastik wird vorher unter einem Lichtmikroskop im Auflicht bei 50- und 100-facher Vergrößerung untersucht und vermessen (Länge und Durchmesser); hierfür wird ein Filter verwendet, das ein Raster für die Feststellung der Position der Partikel für die anschließende Analyse und für den Ausschluss von Fasern (z. B. natürlichen Ursprungs) oder von verunreinigten Partikeln von der Zählung besitzt.

Filtern eines bekannten Volumens der (zuvor behandelten) Wasserdispersion auf ein Filter aus einem für die gewählte spektralanalytische Technik (z. B. Silizium mit Mikro-FTIR) geeigneten spezifischen Material zur Identifizierung und Zählung des vorhandenen Mikroplastiks mit spektralanalytischen Techniken.

Bei **gasförmigen Proben** werden Luftproben in Übereinstimmung mit den spezifischen Referenznormen für die Staubsammlung in Luft (Luftemissionen, Luft der Arbeitsumgebung) genommen.

4.2 Anwendung der Analyseergebnisse

Unabhängig von den verschiedenen Matrices, die analysiert wurden, sind alle Ergebnisse aus den Bewertungen des Mikroplastiks miteinander vergleichbar. Werte aus erzeugten Abfällen, aus dem Abwasser, aus der Luft am Arbeitsplatz oder aus den Emissionen in die Atmosphäre können analysiert und miteinander verglichen werden, so dass eine Bilanz des Mikroplastiks erstellt werden kann für:

- eine bestimmte Textilherstellung;
- die textilen Erzeugnisse, die auf den Markt gebracht werden (was vielmehr eine Analyse der potentiellen Erzeugung von MP während ihrer Lebensdauer als Kleidungsstück ermöglicht);
- einen beliebigen anderen betrachteten Prozess/Halbzeug/Fertigprodukt.

Bei der Durchführung der Analyseverfahren sind die verschiedenen Probenahme-, Vorbereitungs- und Reinigungsprozesse zu berücksichtigen, die entsprechend den Eigenschaften der zu untersuchenden Probe gewählt wurden.

Das Analyseverfahren ist für alle Proben, die im Vorfeld herzustellen sind, anwendbar und geeignet.

4.3 Anwendungsgebiete und Anwendungsbeschränkungen

Entsprechend den verschiedenen Vorbereitungs- und Reinigungsprozessen der Proben und den anschließend angewendeten Analysetechniken können sich spezifische Anwendungsgebiete und Anwendungsgrenzen ergeben.

Besonders bei Proben unbekannter Herkunft in der Textilbranche, die möglicherweise Salze und organische Stoffe enthalten, müssen zunächst Untersuchungen durchgeführt werden, wie beispielsweise im Fall von flüssigen Proben mit wässriger Matrix:

- Bestimmung der Leitfähigkeit;
- Bestimmung des CSB;
- Bestimmung des Gesamtgehalts an suspendierten Feststoffen (mit technischer Filtrationsmembran);
- Voruntersuchung mit Lichtmikroskop zur Abschätzung der mikroskopischen Bildqualität.

5 Materialien, Reagenzien, Geräte und Ausrüstung

5.1 Grundsätze und Verfahren zur Verringerung der Umgebungsbelastung

Die Verunreinigung durch luftgetragene Fasern tritt immer wieder auf, und es wird empfohlen, ein Verfahren zur Verringerung dieser Verunreinigung anzuwenden.

5.1.1 Verfahren zur Verringerung von Verunreinigungen

Ausrüstung für die Reinigung

- 1) Alle Geräte aus Glas sind vorab mit entmineralisiertem Wasser, das auf Filtern mit einer Porengröße von 0,45 Mikrometer (Nitrat-/Acetat-Celluloseestergemisch) gefiltert wurde, und mit einer Waschlösung zu waschen und anschließend vor jeder Nutzung zu spülen.
- 2) Alle Geräte aus Glas sind vorab mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch (1 : 1) (das auf Filtern mit einer Porengröße von 0,45 Mikrometer (Nitrat-/Acetat-Celluloseestergemisch) gefiltert wurde) und mit einer Waschlösung zu waschen und anschließend vor jeder Nutzung zu spülen. Nach der Waschung muss das Glasgerät mit geeigneten Schutzmaßnahmen (z. B. Aluminiumfolie zum Verschließen der Öffnungen) gelagert und geschützt werden, um eine mögliche Ablagerung von in der Luft vorhandenem MP zu verhindern.
- 3) Gleiches gilt für die Teilproben und die Probenbehälter, die bevorzugt aus Glas und Metall bestehen sollten.
- 4) Vor der Untersuchung jeder Probe werden alle Oberflächen abgewischt.
- 5) Alle Pinzetten, Messfühler und die Hände werden vor jedem Vorgang wie Filtrieren oder das Öffnen einer Petrischale zu Untersuchungszwecken abgespült.
- 6) Schutzkleidung (einschließlich Laborkittel), die während der Handhabung der Proben von den Analytikern getragen wird, sollte bevorzugt aus Naturfasern statt synthetischen Fasern bestehen und sollte nicht aus synthetischem Fleecegewebe oder ähnlichen Materialien bestehen.
- 7) Im Laboratorium oder am Arbeitsplatz wird der Durchgangsverkehr auf ein Mindestmaß beschränkt.

Die „Belastung der Umgebung“ kann aber berücksichtigt werden, indem gleichzeitig für jedes Analyselos eine „Blindprüfung“ durchgeführt wird, bei der eine Probe von entmineralisiertem Wasser und einer anderen für die Prüfung verwendeten Waschlösung einmal analysiert werden. Der festgestellte MP-Wert wird als „Belastung der Umgebung“ definiert und bei den verschiedenen analytischen Bewertungen der zu untersuchenden Proben berücksichtigt.

Die „Blindprüfung“ ist für jedes Analyselos durchzuführen.

5.2 Reagenzien

5.2.1 15%ige Wasserstoffperoxidlösung

Für die Oxidation von organischen Stoffen vor der Filtration darf Wasserstoffperoxid RPE verwendet werden.

5.2.2 Natriumhypochlorit (1 M)

Frisch hergestellte Natriumhypochloritlösung mit (35 ± 2) g/l aktivem Chlor (± 1 M) entsprechend Methode Nr. 2 „Bestimmte Eiweißfasern/Bestimmte andere Fasern/Hypochlorit“ der Verordnung (EU) Nr. 1007/2011 vom 27. September 2011 über die Bezeichnungen von Textilfasern und die damit zusammenhängende Etikettierung und Kennzeichnung der Faserzusammensetzung von Textilerzeugnissen. Sie wird zum Auflösen von Wolle bei der Herstellung von Standards verwendet.

5.2.3 Waschlösungen

5.2.3.1 Waschlösung mit 1 % (m/V) Natriumchlorid

10 g analysenreines NaCl werden in 1 000 ml entionisiertem Wasser gelöst.

Die Lösung muss durch Verdünnen des reinen NaCl-Salzes in entmineralisiertem Wasser hergestellt werden.

Eine Probe dieser Lösung muss ebenfalls analysiert werden, um den MP-Gehalt des Salzes zu bestimmen, um ihn bei der Durchführung der Analyse berücksichtigen zu können.

5.2.3.2 Waschlösung mit 1 % (m/V) Tensid

10 g analysenreine nichtionische Tenside werden in 1 000 ml entionisiertem gereinigtem Wasser gelöst.

Die Lösung muss durch Verdünnen des Tensids in entmineralisiertem Wasser hergestellt werden, vorzugsweise nichtionisch (Zusammensetzung und/oder IR/Raman-Spektrum müssen bekannt sein, um bei der Analyse subtrahiert werden zu können).

Eine Probe dieser Lösung muss ebenfalls analysiert werden, um den MP-Gehalt zu bestimmen, um ihn bei der Durchführung der Analyse berücksichtigen zu können.

5.2.3.3 Wasser/Ethanol-Lösung (1 : 1)

99,5%iges Ethanol und entmineralisiertes Wasser im Mischungsverhältnis 1 : 1. Es ist möglich, die zuvor mit einem Filter aus Celluloseester oder Cellulosenitrat filtrierte Ethanollösung zu verwenden.

5.3 Glasgeräte und Ausrüstungen

- Filtersystem aus Stahl oder Glas mit einem Trichter mit Fassungsvermögen von 100 ml, 500 ml, 1 000 ml, 2 000 ml komplett mit Sinterwand, Klemme und kodiertem Erlenmeyerkolben;
- Glaskolben und Glasflaschen mit Glaskappe;
- Pinzette;
- Mikropipetten;
- Petrischalen (aus Glas);
- Mikro-Objektträger;
- Kolben (20 ml bis 2 000 ml);
- Filterhalterung.

5.3.1 Waschen der Glasgeräte, Ausrüstungen und Filtersysteme

Alle verwendeten Materialien müssen zunächst mit entmineralisiertem Wasser und anschließend mit einem Wasser/Ethanol-Gemisch (1 : 1) gewaschen werden, um alle MP-Rückstände zu entfernen; unmittelbar nach dem Waschen müssen sie an der Luft trocknen, wobei sie mit Aluminiumfolie oder mit einem Uhrglas bedeckt werden. Bild 1 a und Bild 1 b zeigen das verwendete Filtersystem und das Filter.



Bild 1 a — Filtersystem aus Stahl oder Glas



Bild 1 b — Filterhalterung

Bild 1

Laborgeräte

— Kombinierte Mikroskope zur molekülspektroskopischen Analyse, die verwendet werden können:

- 1) Mikro-FTIR für Partikel zwischen 5 Mikrometer und 10 Mikrometer (20 Mikrometer);
- 2) Mikro-Raman für Partikel zwischen 0,2 Mikrometer und 0,5 Mikrometer.

5.3.2 Mikro-FTIR

Erfassungsmodus: Transmission

Detektor: gekühlt

Spektrale Auflösung: hoch

Erfassungsdauer: 22 s (Abtastungen: 64)

Spektrenformat: Absorption

Blende: Breite 150 Mikrometer, Höhe 150 Mikrometer

Bereich der Detektorspektren (gekühlt): 4 000 cm^{-1} bis 675 cm^{-1}

Auflösung: 4,0 cm^{-1}

5.3.3 Mikro-Raman

Anregung: Laser könnten eine Wellenlänge von 457 nm, 532 nm, 633 nm und 785 nm haben.

Objektive: verschiedene Objektive mit unterschiedlichen Vergrößerungen und numerischen Blenden.

Spektroskopische Systeme

Ultra-high-throughput-Spektrometer (Ultrahochdurchsatz) (UHTS300) im sichtbaren Bereich, Gitter: 600 g/mm

*Ultra-high-throughput-Spektrometer (Ultraschallspektrometer) (UHTS400) im nahen Infrarot-Bereich,
Gitter: 300 g/mm*

CCD-Kamera

Schwarz beleuchtete Kamera für den Betrieb im sichtbaren Bereich

Dunkelstromarme CCD-Kamera im nahen Infrarot-Bereich

Erweiterungen: Dunkelfeldmikroskopie; Software zur Partikelidentifizierung und -messung

5.3.4 Lichtmikroskopie

Zu den Mikroskoparten, die für die Faseridentifizierung geeignet sind, gehören Projektionsmikroskope und visuelle mikroskopische Bildanalysegeräte. Durchlichtmikroskope mit Skaleneinteilung direkt auf der optischen Linse sind ebenfalls einsetzbar.

5.3.5 Sonstige Laborgeräte

- Leitfähigkeitsmessgerät;
- Ausrüstung für die CSB-Bestimmung (Schnelltests sind ebenfalls zulässig);
- Laborwaage;
- Laborherd;
- Ultraschallbad;
- Vakuumfiltrationssystem;
- Software für die Bildanalyse, morphologische Identifizierung, Klassifizierung der Abmessungen und Mapping

5.4 Filter

Die Wahl des Filters erfolgt entsprechend der gewählten Spektrographieart und der Größe der zu bestimmenden Partikel.

5.4.1 Mikro-FTIR-Filter

- 1) Bei der Mikro-FTIR-Analyse (Reflexion und Transmission) können Filter mit einer Porengröße von maximal 5 Mikrometer verwendet werden, die aus Folgendem bestehen:
 - Aluminiumoxidfilter, Spektralbereich zwischen $4\,000\text{ cm}^{-1}$ und $1\,250\text{ cm}^{-1}$, im Transmissionsmodus (Porendurchmesser 0,02 Mikrometer bis 0,2 Mikrometer);
 - Siliziumfilter, Spektralbereich zwischen $4\,000\text{ cm}^{-1}$ und 600 cm^{-1} im Transmissions- oder Reflexionsmodus. Porendurchmesser 5 Mikrometer, Zwischenraum 12 Mikrometer, Dicke 500 Mikrometer;
 - Gold-Polycarbonat-Filter, Spektralbereich zwischen $4\,000\text{ cm}^{-1}$ und 400 cm^{-1} im Reflexionsmodus (1 Mikrometer, 25 mm);
 - Celluloseacetat-/Cellulosenitratfilter, Spektralbereich zwischen $4\,000\text{ cm}^{-1}$ und 400 cm^{-1} im Reflexionsmodus oder Mikro-ATR.

- 2) Bei der Analyse durch abgeschwächte Reflexion (ATR, en: attenuated reflectance) können Filter mit einer Porengröße von mindestens 5 Mikrometer verwendet werden, und zwar im Einzelnen:
- Celluloseacetat-/Cellulosenitratfilter:
 - Porendurchmesser 0,45 Mikrometer, 0,8 Mikrometer; runde Form (Durchmesser 47 mm und 25 mm);
 - PVDF (Polyvinylidenfluorid):
 - Porendurchmesser (5 Mikrometer), runde Form (Durchmesser 47 mm).

5.4.2 Mikro-Raman-Filter

Bei der Mikro-Raman-Analyse dürfen die folgenden Filter verwendet werden:

- Celluloseacetat-/Cellulosenitratfilter, goldbeschichtete Polycarbonat-Membran, Siliziumfilter (Bild 2).

Folgende Maße können üblicherweise verwendet werden:

- Durchmesser 13 mm, Durchmesser 25 mm, Durchmesser 47 mm, Seitenlänge 10 mm.

Folgende Porengrößen können üblicherweise verwendet werden:

- 0,45 Mikrometer, 0,8 Mikrometer, 1 Mikrometer, 5 Mikrometer, sonstige.

Alle Filter haben eine geeignete Form und stimmen mit der Form überein, die durch das Gerät für die Molekülmikroskopie vorgegeben ist. Sie können insbesondere eine runde oder quadratische Form haben (Bild 2).

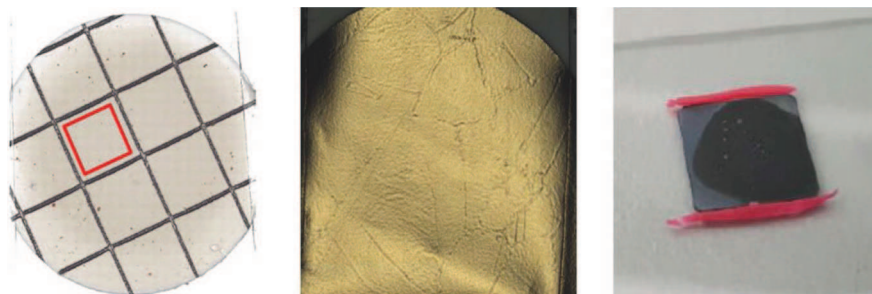


Bild 2 — (von links) Celluloseacetat-/Cellulosenitratfilter, goldbeschichtete Polycarbonat-Membran und Siliziumfilter

5.4.3 Ablesen der Filter

Alle verwendeten Filter sind nahezu flach. Bei der Trocknung nach dem Filtriervorgang kann eine Wölbung auftreten. Für die Messung werden sie so flach wie möglich eingesetzt.

Siliziumfilter besitzen zwei Seiten (eine spiegelnde und eine dunklere Seite). Das Filter wird mit der spiegelnden Seite nach oben eingesetzt (Seite, die zum Filtrieren verwendet werden soll), sodass die Mikroporen das Anhaften des Mikroplastiks und dessen Aufrechterhaltung während der folgenden Zähl- und Identifizierungsschritte mit Mikro-FTIR- oder Mikro-Raman-Spektroskopie erleichtern, auch wenn das Filter trocken ist.

Das Siliziumfilter zeigt ein starkes Raman-Peak, aber keine Fluoreszenz. Si-Peaks können bei der Partikelidentifizierung vernachlässigt werden.

5.4.4 Verunreinigungen und Reinigungsprozess

Die Filter werden in Petrischalen aus Glas (nicht aus Kunststoff) aufbewahrt, um Verunreinigungen durch die Schale selbst zu verringern. Nach Möglichkeit bleibt das Filter vor der Untersuchung bedeckt.

Alle Filter müssen neu sein oder vor der Verwendung gereinigt werden.

Die Filter werden vor der Filtration unter dem Lichtmikroskop untersucht, um sicherzustellen, dass sich auf ihrer Oberfläche keine störenden Partikel befinden, die von der Verpackung, ihrer Handhabung oder dem Produktionsprozess selbst stammen können. Die Art der Reinigung hängt von der Art des Filters ab. Es kann ein physikalischer Vorgang, wie ein Ultraschallbad, oder eine chemische Behandlung durch kurzes Eintauchen in ein Lösemittel (reines Ethanol RPE) für 10 Minuten durchgeführt werden.

Um die Gesamtkosten für die Analyse zu senken, wurde für das Siliziumfilter die Möglichkeit vorgesehen, dasselbe Filter für mehrere Analysen mit folgendem Wasch- und Qualitätskontrollverfahren wiederzuverwenden:

- mindestens 3 wiederholte Beschallungen im Ultraschallbad von jeweils 10 min in hochreinem Wasser (bei jeder Beschallung auszutauschen).
- Eintauchen des Siliziumfilters in 10 ml reines Ethanol RPE vor der Verwendung.

6 Herstellung von Standardproben

Diese Anleitung umfasst ein einheitliches Verfahren zur Herstellung von standardisiertem faserförmigen Mikroplastik [13] für:

- nicht zum Kauf verfügbare Standardproben oder Referenzmaterialien (1);
- die Bewertung und Validierung aller Ansätze von der Probenahme bis zur Identifizierung des Mikroplastiks (1);
- das Verständnis der biologischen und ökologischen Auswirkungen von Mikroplastikmüll in Form von Fasern mit einer Breite, die ähnlich der in der Natur vorkommenden Breite ist (1);
- die Verbesserung der Qualität der Probenahme, der Verarbeitung und der MP-Datenerfassung, um auch einen Vergleich zwischen verschiedenen internationalen Studien zu ermöglichen (2).

Verweisungen

- (1) M. Cole A novel method for preparing microplastic fibres Scientific Report (2016)
- (2) Standardised protocol for monitoring microplastics in sediments. Technical report — JPI ocean Deliverable D4.2 (2018)

6.1 Herstellung von (faserförmigen) Mikroplastik-Standardproben

Dieses Verfahren beschreibt, wie synthetische Fäden zugeschnitten werden, um Lösungen mit einer Konzentration zwischen 70 Filamenten/Liter und 850 Filamenten/Liter zu erhalten. Ein Beispiel (Tabelle 1), das eine Reihe von Fadentypen zeigt, die für die Herstellung von Standardproben verwendet wurden, sowie die jeweils erhaltenen Konzentrationen, ist unten angegeben.

Tabelle 1 — Herstellung von Standardproben (Beispiel)

NAME DER PROBE (Polymer, Farbe, Anzahl der Filamente)	Sammelmedium aus entmineralisiertem Wasser (ml)	Theoretische Konzentration (Anzahl der Filamente/Liter)
Nylon 6.6, blau (68 Filamente)	300	227
	500	136
	900	76
Nylon 6, mehrfarbig (128 Filamente)	300	427
	500	256
	900	142
Nylon 6 (180 Filamente)	300	600
	500	360
	900	200
Polyester, beige (256 Filamente)	300	833
	500	512
	900	284
Polypropylen, orange (72 Kokon(doppel)fäden)	300	240
	500	144
	900	80

Ein Beispiel für ein „manuelles Mikrotom“, das Proben von 200 Mikrometer bis 800 Mikrometer schneiden kann, ist in A.1 angegeben.

Für die Herstellung der Standardproben wird ein Garn aus handelsüblichem Material mit einer bekannten Anzahl an Filamenten verwendet. Vor dem Schneiden wird unter dem Lichtmikroskop überprüft, ob die Anzahl der Filamente in dem Abschnitt stimmt (Bild 3).



Bild 3 a — PA-Faden



Bild 3 b — PA-Faden mit 180 Filamenten



Bild 3 c — Zählung der Filamente

Bild 3

Anschließend erfolgt das Zuschneiden mit dem Mikrotom. Um die Mikrotomführung zu befüllen (um den zu schneidenden Faden besser in dem Schlitten zu fixieren), kann Wolle verwendet werden (Bild 4). Wegen ihres unregelmäßigen Durchmessers von etwa 16 μm bis 20 μm und ihrer schuppigen Oberfläche sind die Wollfasern unter dem Lichtmikroskop gut erkennbar; außerdem können sie durch eine einfache oxidative Behandlung beseitigt werden (Bild 5).



Bild 4 a — PA und Wolle im Mikrotom

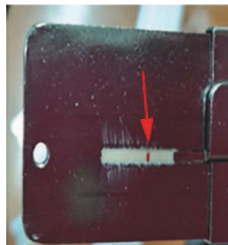


Bild 4 b — Geschnittener PA-Faden in der Wolle



Bild 4 c — Anheben der Fasern (0,2 mm)



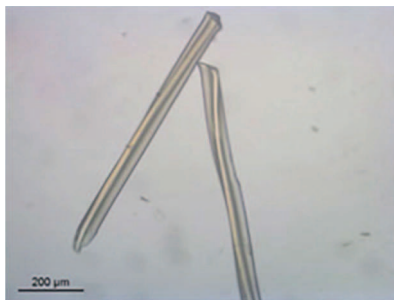
Bild 4 d — Zuschneiden der Fasern mit einer Klinge



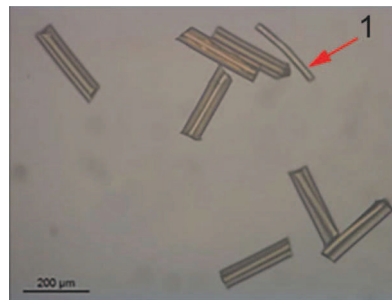
Bild 4 e — Geschnittene Fasern in einem Becherglas

Bild 4

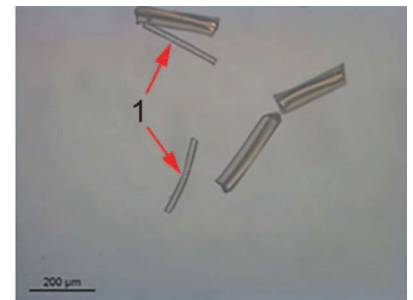
Die zugeschnittenen Faserlängen werden unter einem Lichtmikroskop überprüft:



**a) Länge: 829 µm;
Durchmesser: 55 µm**



**b) Länge: 216 µm bis 235 µm;
Durchmesser: 55 µm bis 60 µm**



Legende

1 Wolle

Bild 5 — Mit dem Lichtmikroskop aufgenommene Bilder von PA-Fasern, die mit dem Mikrotom auf 800 Mikrometer und auf 200 Mikrometer zugeschnitten wurden (gemischt mit Wolle)

6.2 Herstellung von Standardproben (wasserbasiert)

Nach dem Zuschneiden mit dem Mikrotom werden die synthetischen Filamente mit Wollfasern umwickelt. Alle Fasern werden mit der Schneidklinge eingesammelt und in 10 ml H₂O (entmineralisiert) mit 5 ml bis 7 ml Natriumhypochlorit in einem 50-ml-Kolben dispergiert.

NaClO löst die Wollfasern auf, wodurch die Zählung der synthetischen Fasern unter dem Mikroskop nach Methode Nr. 2 „Bestimmte Eiweißfasern/Bestimmte andere Fasern/Hypochlorit“ der Verordnung (EU) Nr. 1007/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. September 2011 über die Bezeichnungen von Textilfasern und die damit zusammenhängende Etikettierung und Kennzeichnung der Faserzusammensetzung von Textilerzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinie 73/44/EWG des Rates

und der Richtlinien 96/73/EG und 2008/121/EG des Europäischen Parlaments und des Rates (Text von Bedeutung für den EWR) erleichtert wird.

Die Suspension wird in dem 50-ml-Kolben mit einem mechanischen Rührer bei 130 min^{-1} für 40 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach der Behandlung mit Natriumhypochlorit werden die synthetischen Fasern in einen großen Erlenmeyerkolben geschüttet. Der Kolben wird mit Aliquoten von 50 ml ultrareinem Wasser gewaschen, um die angegebenen Volumen (300 ml, 500 ml oder 900 ml) zu erreichen. Um eventuell an den Wänden anhaftende Fasern abzunehmen und in den Erlenmeyerkolben zu überführen, wird der Kolben, bevor die angegebenen Volumen erreicht sind, zusätzlich mit 10 ml einer 1 : 1-Lösung von entmineralisiertem Wasser/Ethanol gespült. Dieser Schritt hilft dabei, die verbleibenden Fasern zurückzugewinnen. Im Anschluss wird das letzte Aliquot aus hochreinem Wasser hinzugegeben, das erforderlich ist, um das angegebene Volumen zu erreichen.

6.3 Filtration der Standardfaser (wasserbasiert)

Das Sammeln von faserförmigen Mikropartikeln erfolgt auf einem oder mehreren Filtern mit einer Porengröße, die geringer ist als der kleinste Durchmesser der für die Standardprobe verwendeten Fasern.

Ausrüstung:

- Erlenmeyerkolben mit Standardlösung (500 ml bis 2 000 ml);
- Filtersystem mit 250-ml-Einlauftrichter;
- Filter;
- Vakuumpumpe.

6.3.1 Filtrationsprozess

Die gesamte Fasersuspension wird nach und nach filtriert (in 50-ml-Schritten).

Nach dem Filtrieren der gesamten Fasersuspension werden die Trichterwände mit einer geringen Menge Wasser/Ethanol-Gemisch (1 : 1) und einer Pasteur-Pipette aus Glas gewaschen, um die eventuell am Glas anhaftenden Mikropartikel zurückzugewinnen.

Der abschließende Waschgang (des Filtersystems, der Dichtung und des Kolbens mit der Faserlösung) für die Rückgewinnung wird mit einer 1 : 1-Lösung von Wasser/Ethanol durchgeführt und es wird auf Filter Nr. 2 filtriert (siehe unten).

Der Waschvorgang muss mindestens dreimal wiederholt werden, wobei jedes Mal ein Aliquot von 30 ml des Wasser/Ethanol-Gemischs (1 : 1) zu verwenden ist. Für den letzten Waschgang werden ein Aliquot und eine Pasteur-Pipette aus Glas verwendet, um den Filtertrichter, die Dichtung usw. gründlich zu waschen.

Es werden zwei Filter verwendet, um alle Mikropartikel zu sammeln, die bei allen Filtrations- und Waschvorgängen in jeder Lösung mit einer bekannten Konzentration aufgefangen wurden.

- Filter Nr. 1, auf dem die Mikropartikel der Standardlösung und der Lösung für den ersten Spülgang des Kolbens und des Filtersystems gesammelt wurden.
- Filter Nr. 2, auf dem die Mikropartikel aus den nachfolgenden Spülungen mit der Waschlösung und der Lösung für die anschließende gründliche Spülung des Erlenmeyerkolbens und aller Komponenten des Filtersystems gesammelt wurden.

6.4 Qualitätskontrolle der Standardprobe und der Durchführung

Für jede Probe sind mindestens 5 Parallelproben je Typ des synthetischen Polymers anzufertigen. Für jedes Garn und jedes Polymer sind mindestens vier Suspensionen von 300 ml, 500 ml und 900 ml herzustellen, um vier verschiedene Konzentrationen mit der gleichen Anzahl von Filamenten zu erhalten.

Für jede Parallelprobe wird die Anzahl der Partikel in einem bestimmten Volumen als die Summe der auf Filter 1 (Hauptlösung) und Filter 2 (Waschwasser) gesammelten Partikel angegeben.

Berechnung:

$$\text{Anzahl der Filamente (1)/l} = \frac{\text{Anzahl der Partikel} \times 1\,000}{\text{Volumen der Lösung}}$$

wobei die Anzahl der Filamente die Anzahl der Partikel bedeutet, die durch automatische oder manuelle Zählung als die Summe der auf Filter 1 oder Filter 2 gezählten Partikel erhalten wurde.

Tabelle 2 zeigt, wie die Werte einzutragen und für jede analysierte Probe zu berechnen sind:

- Name der Probe (Art des Polymers, Anzahl der Filamente) und theoretische Konzentration der Standardprobe;
- Anzahl an Parallelproben;
- Anzahl der Partikel (Standardfasern), die bei Filtration der gesamten Lösung auf FILTER 1 gezählt wurden;
- Anzahl der Partikel (Standardfasern), die bei der Waschung des Kolbens und des Filtersystems mit dem Wasser/Ethanol-Gemisch (1 : 1) auf FILTER 2 gezählt wurden;
- Gesamtzahl der Partikel (Summer der auf FILTER 1 und FILTER 2 gezählten Partikel);
- prozentualer Anteil (%) der Fasern jeder Parallelprobe.

Tabelle 2 — Durchschnittswert der MPs (Anzahl der Filamente/Liter) von 5 Parallelproben verglichen mit den theoretischen Werten und prozentualer Rückgewinnung

	Parallel- proben	Anzahl der Filamente in der ersten Probe: 300 ml (gesamte Lösung)	Anzahl der Filamente (Spülgang)	Gesamtzahl der Filamente	Prozentuale Rück- gewinnung
NAME DER PROBE (Polymer, Anzahl der Filamente) Anzahl der Filamente/Liter (theoretisch)	Nr. 1				
	Nr. 2				
	Nr. 3				
	Nr. 4				
	Nr. 5				
	Durch- schnitt				
	Parallel- proben	Anzahl der Filamente in der ersten Probe: 500 ml (gesamte Lösung)	Anzahl der Filamente (Spülgang)	Gesamtzahl der Filamente	Prozentuale Rück- gewinnung
NAME DER PROBE (Polymer, Anzahl der Filamente) Anzahl der Filamente/Liter (theoretisch)	Nr. 1				
	Nr. 2				
	Nr. 3				
	Nr. 4				
	Nr. 5				
	Durch- schnitt				
	Parallel- proben	Anzahl der Filamente in der ersten Probe: 900 ml (gesamte Lösung)	Anzahl der Filamente (Spülgang)	Gesamtzahl der Filamente	Prozentuale Rück- gewinnung
NAME DER PROBE (Polymer, Anzahl der Filamente) Anzahl der Filamente/Liter (theoretisch)	Nr. 1				
	Nr. 2				
	Nr. 3				
	Nr. 4				
	Nr. 5				
	Durch- schnitt				

Die **kleinste annehmbare Standard-Rückgewinnungsrate** beträgt 80 %.

Es wurde beobachtet, dass die Standard-Rückgewinnungsrate von dem Verhältnis zwischen der Partikelzahl und dem Volumen (ml), in dem sie dispergiert sind, abhängt. Es wurde eine Rückgewinnungsrate zwischen 80 % und 100 % für Lösungen festgestellt, die Mikroplastik mit einer Konzentration von mindestens 200 Partikel/Liter enthalten.

Wenn die oben genannte Rückgewinnungsrate nicht erreicht wird, dann wird überprüft, ob der Wasch- und Filtrationsvorgang ordnungsgemäß durchgeführt wurde und ob die Filtrationsausrüstung ordnungsgemäß funktioniert und dicht ist.

6.5 Mikroplastikzählung mit Lichtmikroskop oder Mikro-FTIR bzw. Mikro-Raman

Da in den Laboratorien unterschiedliche Geräte zum Einsatz kommen können, können keine allgemeingültigen Anleitungen für die Analyse mit dem Mikroskop, mit Mikro-FTIR oder mit Mikro-Raman angegeben werden.

6.5.1 Untersuchung mit dem Mikroskop

Das Mikroplastik wird vorsorglich mit einem Lichtmikroskop im Auflicht bei 50-facher und 100-facher Vergrößerung auf einem Filter (Celluloseacetat-/Cellulosenitratfilter) untersucht und vermessen (Länge und Durchmesser), um die Position der Partikel für nachfolgende Analysen feststellen zu können.

- Nach der Filtration, wenn das Filter noch feucht ist, kann das Mikroplastik untersucht und gezählt werden. In diesem Zustand bleibt das Filter idealerweise flach.
- Wenn das Filter gewölbt und dadurch unter dem Mikroskop zu schwierig zu untersuchen ist, wird es mit doppelseitigem Klebeband auf den Objektträger geklebt (Bild 6).



Bild 6 — Vorbereitung der Filter für die Analyse mit Lichtmikroskop

6.5.2 Ablesung des Filters

Die (faserförmigen) MPs werden im Filterbereich gezählt.

Erfolgt die Zählung manuell, wird jedes Filter von links nach rechts abgelesen; dann wird mit der Reihe darunter fortgefahren und von rechts nach links abgelesen. Ein Raster mit Buchstaben (Spalte) und Zahlen (Zeile) auf dem Filter (oder eine Rasterprojektionslinse oder eine andere vergleichbare Vorrichtung, die ein Raster zur leichteren Zählung auf dem Filter erzeugen kann) ist hilfreich, um sicherzustellen, dass Elemente nicht doppelt gezählt werden (Bild 7).



Bild 7 — Vorgang zur Ablesung des Filters

6.5.3 Verunreinigungen

Es wird überprüft, ob das neue Filter keine Fremdstoffe enthält.

Alle Naturfasern werden von der Zählung ausgeschlossen, wobei zu berücksichtigen ist, dass die äußere Oberfläche der am häufigsten auftretenden Naturfasern unregelmäßig und nicht glatt ist (Bild 8 und Bild 9).



Bild 8 — Beispiele für Verunreinigungen in einem sauberen Filter

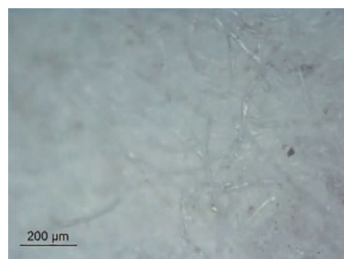


Bild 9 — Beispiel für Fasern aus einer Cellulosematrix des Filters

6.5.4 Zählung der Mikroplastik

Das Ergebnis der Zählung ist die Summe des faserförmigen Mikroplastiks, das in jedem Quadrat des Rasters mit dem in 6.5.2 angegebenen Ableseverfahren festgestellt wurde (Bild 10).

Die Länge und der Durchmesser des Mikroplastiks werden automatisch mit der Bildanalyse-Software, sofern verfügbar, oder manuell (mit einem Mikroskop) bestimmt.

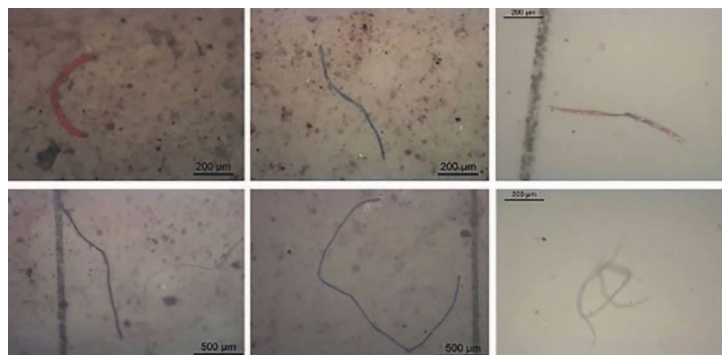


Bild 10 — Beispiele für das mit dem Lichtmikroskop festgestellte Mikroplastik

6.5.5 Zählung der Mikroplastik mit Mikro-FTIR

Jedes Filter muss stabil auf einem Probenhalterschlitten platziert werden, indem spezielle Filterhalter-schlitten mit einem für das Filter geeigneten Hohlraum (z. B. kreisförmig, 13 mm) oder mit einem Objekthalterschlitten (eventuell mit einem Stück doppelseitigem Klebeband, auf dem das Filter platziert wird, damit es während der Analyse nicht verrutscht (z. B. kreisförmig, 47 mm)) verwendet werden.

6.5.5.1 Siliziumfilter

Die Vorbereitung von Filter 1 und Filter 2 erfolgt in Übereinstimmung mit 6.3.

Die Analyse der auf jedem Filter gesammelten Mikroplastik erfolgt durch die Aufnahme eines Bilds des gesamten Filters.

Bild 11 und Bild 12 zeigen das Bild von Filter 1 (a) und Filter 2 (b) und die Vergrößerung einiger Teile, um die zu zählenden Fasern (PA oder PP) stärker hervorzuheben.

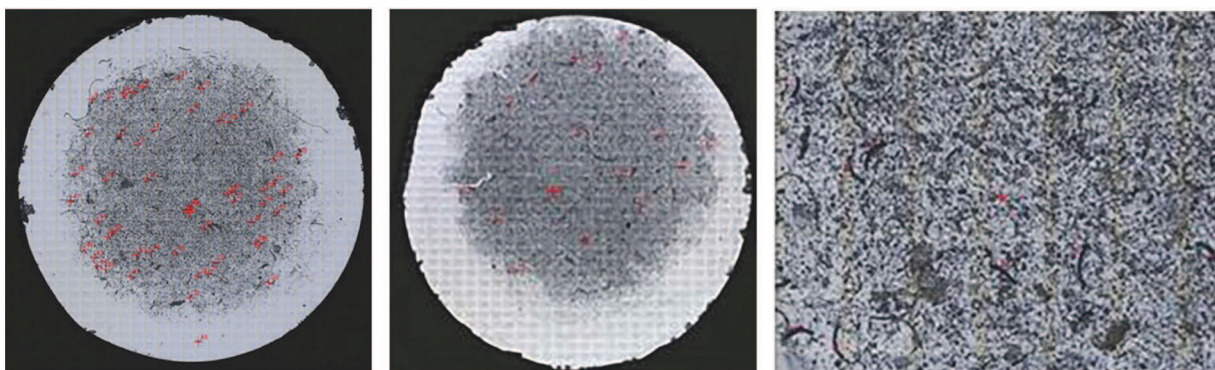


Bild 11 — Fasern, PA 6.6, blau, gesammelt auf einem Si-Filter: (a) Filter 1; (b) Filter 2; (c) Vergrößerung eines Bereichs

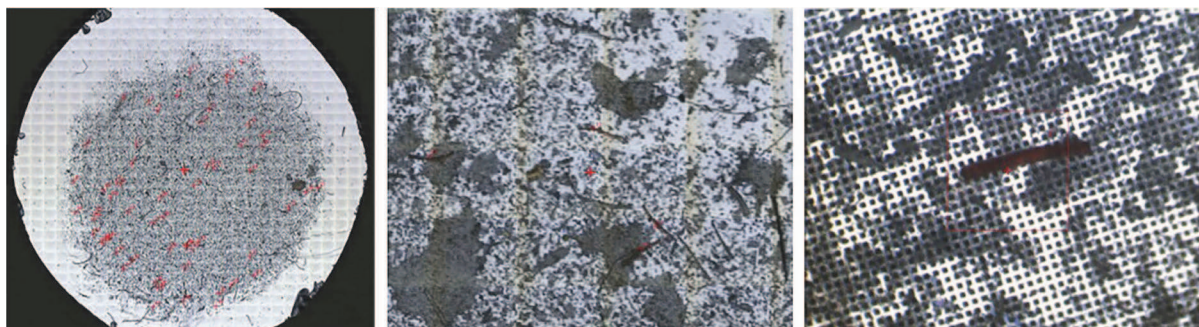


Bild 12 — Fasern, PP, orange, gesammelt auf einem (a) Si-Filter; (b) Vergrößerung eines Bereichs; (c) zusätzliche Vergrößerung zur Unterscheidung zwischen PP und Wolle

Ist das Filter mit zu vielen Fasern bedeckt, wird eine Vergrößerung angewendet, um die Zählung der überlagerten Fasern nicht zu gefährden, und das Bild wird in 9 quadratische Abschnitte aufgeteilt, so dass das gesamte Filter abgedeckt ist, und anschließend wird mit der manuellen Zählung der Mikropartikel in jedem der 9 Abschnitte fortgefahren (Bild 13 und Bild 14).

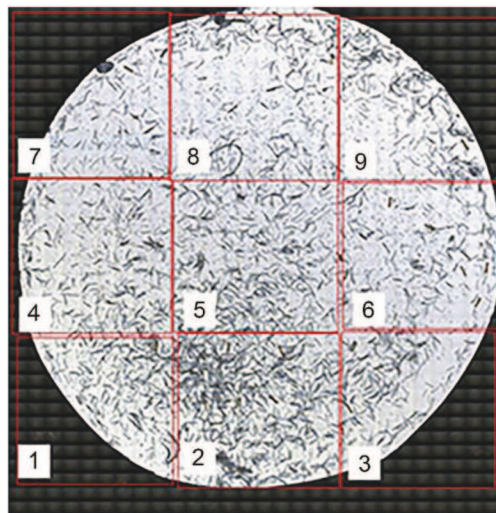


Bild 13 — Bildanalyse des gesamten Siliziumfilters

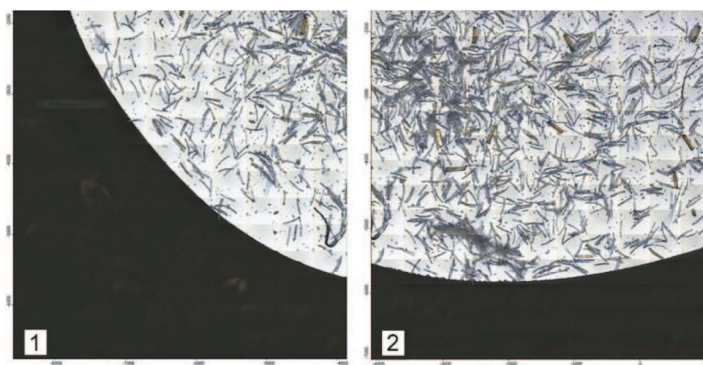


Bild 14 — Bildanalyse von zwei vergrößerten Abschnitten

Alternativ zur manuellen Zählung ist es möglich, mit einer Software für optische Geräte eine automatische Zählung der Mikroplastik vorzunehmen.

6.5.6 Zählung der Mikroplastik mit Mikro-Raman

Die Zählung mit Mikro-Raman darf auf verschiedenen Filtern durchgeführt werden, wie in 5.4 angegeben.

Die Zählung des Mikroplastiks könnte mit einer Software zur automatischen Bildanalyse vorgenommen werden, welche die Partikel oder Fasern in großen Probenbereichen vermessen und klassifizieren kann.

Die Bildanalyse darf mit den folgenden Verfahren durchgeführt werden:

- Weißlichtmikroskopie mit inhärent gleichen Brennpunkten. Hellfeld-/Dunkelfeld-Transmission/Reflexion;
- Auswahl der Objektive: für die Probenvermessung und Raman-Messungen können verschiedene Objektivtypen (mit unterschiedlichen Vergrößerungen und Blenden) verwendet werden, z. B. für einen ersten Überblick und eine anschließende hochauflösende Raman-Analyse;
- automatische Zählung und Klassifizierung der auf dem Filter gesammelten Partikel mit Angabe von Parametern wie Länge, Breite, Seitenverhältnis, äquivalenter Kreisdurchmesser (CE), gruppiert für verschiedene Materialien (Bild 15).

Die Polymerzusammensetzung wird für jedes Mikroplastik, das bei der Bildanalyse identifiziert wurde, mithilfe der molekülspektroskopischen Techniken bestätigt.

Die Grenzen der Identifizierung sind abhängig von der Fluoreszenz, der Probenvorbereitung (verwendete Filter) und der Wellenlänge der Laserquelle.

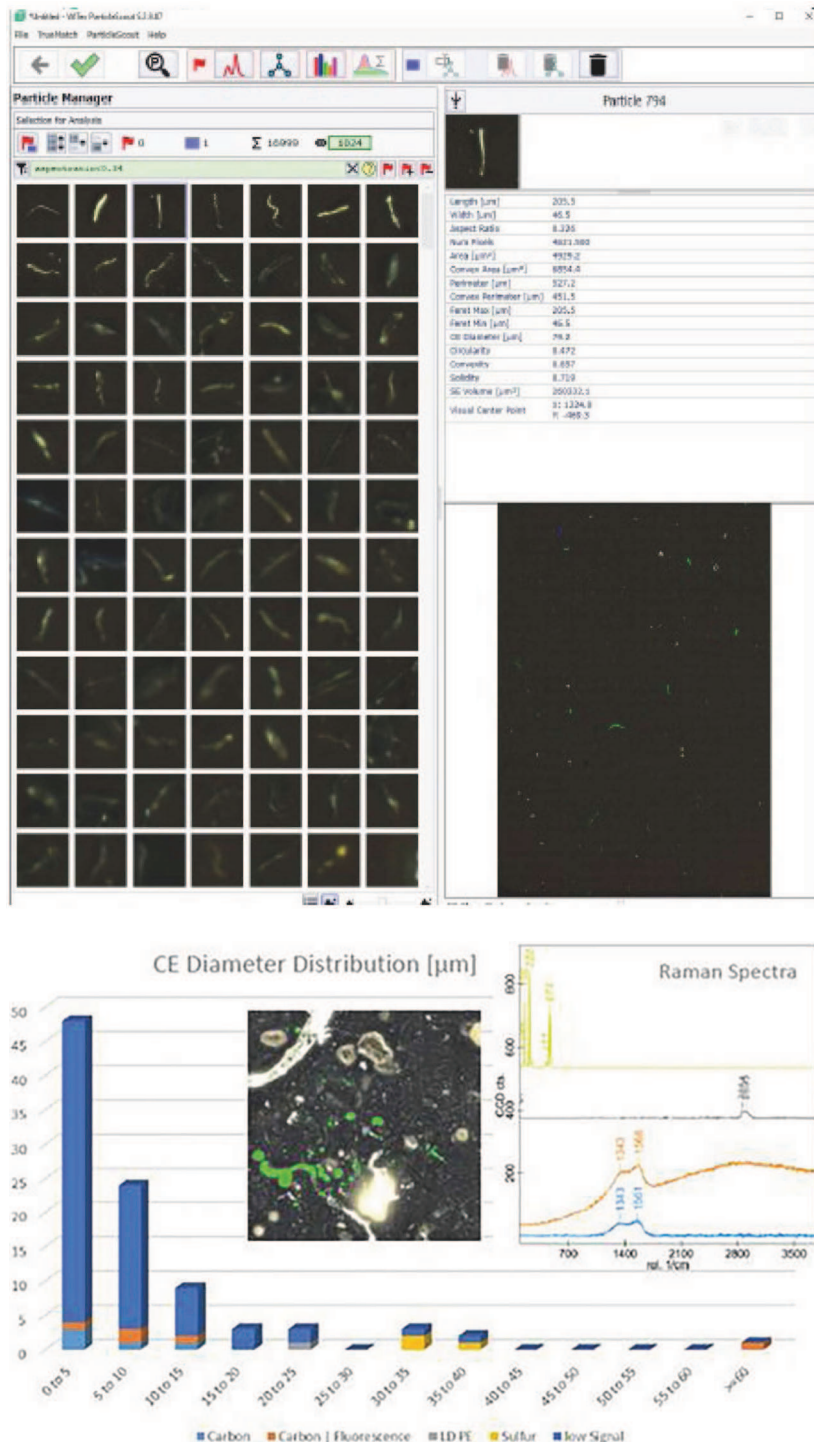


Bild 15 — Zählung und Klassifizierung von Partikeln

7 Probenvorbereitung

Sind im Hinblick auf die Probenahme keine Verweisungen auf eine bestimmte Norm angegeben, könnte ISO/CD 24187, Abschnitt 7 bis Abschnitt 12, in Betracht gezogen werden.

7.1 Feste Matrix (Faser, Textilgewebe oder Derivate)

Bei festen Proben wie Kleidungsstücke oder andere Textilien könnte Teil 1 dieses Verfahrens (CEN) angewendet werden, um eine flüssige Probe für die Prüfung herzustellen.

7.2 Flüssige Matrix (wässrig)

7.2.1 Festlegung von Volumen/Masse der zu filtrierenden Probe und Anzahl der Filter

ISO/TR 21960, ein Technischer Bericht, der von ISO/TC 61/SC 14/WG 4 erarbeitet wurde, enthält empfohlene Werte für Masse und Volumen der zu analysierenden Proben im Verhältnis zu ihrem Ursprung.

Für die Analyse wird ein angemessenes Probenvolumen entsprechend den Werten der folgenden Tabelle 3 entnommen.

Tabelle 3 — Repräsentative Wasserprobenahme

	Sehr hoher Feststoffgehalt	Hoher Feststoffgehalt	Geringer Feststoffgehalt
Filtrierbare Substanzen/ Schwebstoffe	über 500 mg/l	100 mg/l bis 500 mg/l	1 mg/l bis 100 mg/l
Beispiele	Zulaufwasser einer Kläranlage	Straßenentwässerung	Kläranlagenabwasser, Oberflächenwasser
Empfohlenes Proben- volumen für die Partikel- analyse von ~ 50 µm – 1 µm	5 ml	500 ml	1 l

Verweisung¹: SAMPLING, SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF MICROPLASTICS, CURRENT ACTIVITIES IN THE ISO/TC 61/SC 14/WG 4

Ulrike Braun, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin, Deutschland

Claus G. Bannick, Umweltbundesamt (UBA), Berlin, Deutschland

Gegebenenfalls Vorbehandlung. Filtrieren durch ein oder mehrere Filter mit unterschiedlichen Abmessungen und Porengrößen in Abhängigkeit vom Probenvolumen.

Tabelle 4 enthält die empfohlenen Probenvolumen für das Filtrieren durch ein 13-mm-Filter mit einer Porengröße von 1 Mikrometer.

Tabelle 5 enthält die empfohlene Probenmenge für das Filtrieren durch ein 47-mm-Filter mit einer Porengröße von 0,45 Mikrometer.

Tabelle 4 — Empfohlenen Probenmenge für das Filtrieren durch ein 13-mm-Filter mit einer Porengröße von 1 Mikrometer

Probenqualität — Herkunft (wie a) — TSS-Gehalt	TSS (ppm)	Nicht vorbehandelte Probe (filtrierbares Mindestvolumen) in ml	Vorbehandelte Probe (filtrierbares Mindestvolumen) in ml
Abwasser — Ausleitung aus Abwasserbehandlungsanlagen — niedriger Gehalt	< 100 ppm	10	100
Abwasser — Einleitung in Abwasserbehandlungsanlagen — mittlerer Gehalt	< 2 500 ppm	2	20
Belebter Schlamm — suspendierte Biomasse — hoher Gehalt	< 10 000 ppm	1	5

Tabelle 5 — Empfohlene Probenvolumen für das Filtrieren durch ein 47-mm-Filter mit einer Porengröße von 0,45 Mikrometer

Probenqualität — Herkunft (wie a) — TSS-Gehalt	TSS (ppm)	Nicht vorbehandelte Probe (zu filtrierendes Mindestvolumen) in ml	Vorbehandelte Probe (zu filtrierendes Mindestvolumen) in ml
Abwasser — Ausleitung aus Abwasserbehandlungsanlagen — niedriger Gehalt	< 100 ppm	50	200
Abwasser — Einleitung in Abwasserbehandlungsanlagen — mittlerer Gehalt	< 2 500 ppm	10	100
Belebter Schlamm — suspendierte Biomasse — hoher Gehalt	< 10 000 ppm	5	20

7.3 Luftmatrizes

Es werden die Probenahmenvolumen verwendet, die für Folgendes angegeben sind:

- für die Bestimmung von luftgetragenen Partikeln oder für die OSHA-Verfahren im Fall der Luft am Arbeitsplatz;
- für die Bestimmung von Staub durch die UNI-Verfahren im Fall von Emissionen in die Atmosphäre.

7.4 Voruntersuchungen

Um herauszufinden, ob eine Vorbehandlung der flüssigen Probe erforderlich ist, werden die Werte der Leitfähigkeit und des CSB und des Gesamtgehalts an suspendierten Feststoffen der zu analysierenden Probe gemessen und zusätzlich eine Untersuchung mit dem Lichtmikroskop bei 10-facher/50-facher Vergrößerung durchgeführt.

Die behandelten flüssigen Proben sind Abwasser aus der Textilverarbeitung, Kleiderwaschwasser, und Wasser aus industriellen Prozessen.

7.5 Leitfähigkeit

Wenn die Leitfähigkeit höher als 3 000 Mikrosiemens/cm ist, muss das Filter mit einer Lösung von 0,1 M Essigsäure gewaschen werden, um Spuren von anorganischen Substanzen zu entfernen.

7.6 CSB

Ist der CSB höher als 100 ppm, muss eine Voroxidation mit 15%iger H₂O₂-Lösung durchgeführt werden (für eine Dauer zwischen mindestens 7 Tagen und 30 Tagen, je nach Komplexität der Matrix), wobei das Volumen des hinzuzufügenden Wasserstoffperoxids wie folgt berechnet wird:

$$\text{ml H}_2\text{O}_2 \text{ 15 \% hinzuzufügen} = \text{CSB (ppm)} \times \text{Probenvolumen zu behandeln (in Liter)} / 70,06$$

mit dem Ziel, alle Spuren von nicht plastischem organischem Material zu entfernen.

Voruntersuchung mit dem Lichtmikroskop

Abhängig von dem Verhältnis von Gesamtgehalt an suspendierten Feststoffen und chemischem Sauerstoffbedarf sowie von der Voruntersuchung mit dem Lichtmikroskop muss das empfohlene signifikante Mindestvolumen der Probe definiert werden, um annehmbare Filtrationszeiten zu erhalten.

Außerdem wird während der Voruntersuchung mit dem Lichtmikroskop die Probe mit entmineralisiertem Wasser vorab verdünnt, wenn eine hohe Überlagerung von Mikropartikeln vorliegt.

7.7 Vorbehandlung

Die Vorbehandlung (Bild 16) darf auf drei unterschiedliche Weisen durchgeführt werden:

- 1) an der reinen (unbehandelten) Probe;
- 2) an einem Aliquot der hergestellten Probe vor der Durchführung der Filtration;
- 3) auf dem Filter.

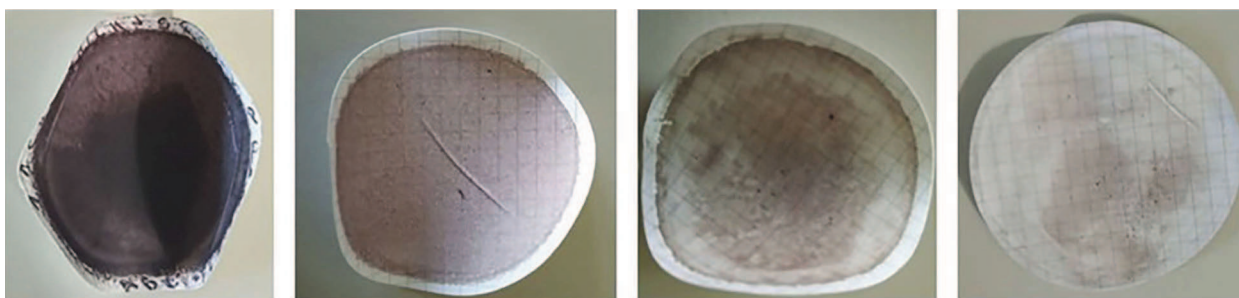


Bild 16 — Beispiele für Nitrat-/Acetatfilter nach verschiedenen Vorbehandlungen mit H₂O₂

7.8 Säurebehandlung (Waschen) (Salzentfernung)

Die Säurebehandlung darf auf zwei unterschiedliche Weisen durchgeführt werden:

- 1) an der reinen (unbehandelten) Probe, falls eine hohe Leitfähigkeit vorliegt oder falls ausgefällte anorganische Salze vorhanden sind;
- 2) auf dem Filter nach Abschluss des Filtriervorgangs.

7.9 Oxidation (Entfernen von organischen Substanzen)

Durchzuführen an der Probe vor dem Filtrieren.

Der Oxidationsprozess erfolgt über einen längeren Zeitraum und hängt von der Dosierung der H_2O_2 -Lösung ab.

7.10 Volumen der H_2O_2 -Lösung

Das Volumen der (15%igen) H_2O_2 -Lösung, das der Probe hinzuzufügen ist, ist proportional zum CSB der zu behandelnden Probe. Mit einer Dosierung von 1,4 ml je 100 ml Probe mit einem CSB von 100 ppm können bereits nach 7 Tagen zufriedenstellende Ergebnisse erhalten werden.

Nachstehend zeigt ein Bild (Bild 17) die Auswirkungen der Zugabe eines Volumens von 0,14 ml, 0,42 ml, 0,7 ml und 1,4 ml (15%ige) H_2O_2 -Lösung zu einer Probe von 100 ml mit einem CSB von 1 000 ppm.



Bild 17 — Wasserproben, die mit unterschiedlichen Volumen einer (15%igen) H_2O_2 -Lösung behandelt wurden

7.10.1 Reaktionszeit

In Abhängigkeit von der Matrix können unterschiedliche Reaktionszeiten auftreten.

Die Mindest-Oxidationszeit hängt von der Qualität der nichtplastischen organischen Matrix ab, die oxidiert werden soll. Die Zeit kann zwischen 7 Tagen und 30 Tagen liegen. Die Oxidationswirkung wird durch Sichtprüfung nachgewiesen, indem die Klarheit der Probe und die Minderung der Farbe/Trübung überprüft werden.

Dadurch könnten möglicherweise Ausfällungen entstehen.

Die folgenden Bilder verdeutlichen diesen Effekt. In Abhängigkeit von der Matrix kann können unterschiedliche Reaktionszeiten auftreten.



1 Tag



3 Tage



7 Tage

Bild 18 — Wasserprobe zu unterschiedlichen Zeitpunkten, die zuvor mit 15%iger H₂O₂-Lösung behandelt wurde

7.11 Homogenisierung/Hydratation und/oder Ultraschallbehandlung der Probe

Die Probe sollte bei 30 °C bis 50 °C kräftig geschüttelt oder sollte alternativ beschallt werden, bevor die Teilprobe hergestellt wird.

Um die Fähigkeit der Mikropartikel, aufgrund ihrer hohen Oberflächenspannung und Hydrophobie an den Wänden anzuhaften, auf ein Mindestmaß zu begrenzen, werden alle Proben vor ihrer Handhabung und insbesondere vor dem Filtrieren einem Ultraschallprozess unterzogen, der die Hydrophilie des Mikroplastiks deutlich erhöht und folglich den Wandeffekt und die Agglomeration, die normalerweise auftreten können und zu einem Verlust der Aussagekraft und Repräsentativität der analysierten Probe führen würden, reduziert bzw. auf ein Mindestmaß begrenzt.

Das Verfahren umfasst die Behandlung im Ultraschallbad bei 20 kHz bis 40 kHz mit unterschiedlichen Behandlungszeiten. Der Benetzungseffekt des Mikroplastiks macht sie in wässriger Lösung vollständig dispergierbar.

Verweisung: Natalia P. Ivleva, Alexandra C. Wiesheu und Reinhard Niessner. Microplastic in aquatic Ecosystems. Angew.Chem.Int. Ed. 2017, 56,1720–1739.

Auf diese Weise wird die Hydratation des vorhandenen Mikroplastiks verbessert, wodurch der normalerweise auftretende Wandeffekt und ein mögliches Aufschwimmen reduziert werden, was auf Oberflächenspannungen und die Hydrophobie des Mikroplastiks zurückzuführen ist.

Die Teilprobe wird dann um einen Faktor verdünnt, der eine ausreichende Partikelzählung im Endfilter ermöglicht.

Die durch Waschen der Ausrüstung (Pipetten, Zylinder, Filtrationsbehälter) erhaltene Rückgewinnungslösung ist im Verdünnungsvolumen enthalten.

7.12 Vorverdünnung

Die Vorverdünnung ist unmittelbar nach der Voruntersuchungsphase durchzuführen, um eine zu prüfende Teilprobe herzustellen.

In der Vorverdünnungsphase der Probe muss deren Homogenisierung vorbereitet werden.

8 Analyseverfahren

In diesem Abschnitt werden die Probenvorbereitung und die Vorgehensweise bei der Zugabe des internen Standards beschrieben.

8.1 Voruntersuchung

Ist die Herkunft der Probe unbekannt, wird eine Reihe von Voruntersuchungen durchgeführt, um das mögliche Vorhandensein von Salzen oder organischen Stoffen zu ermitteln. Für wässrige Proben werden Standardprüfungen wie die Prüfung der Leitfähigkeit, des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB), des Gesamtgehalts an suspendierten Feststoffen (SST, en: total suspended solids) und Lichtmikroskopie (OM, en: optical microscopy) zur Identifizierung der Faserform des Mikroplastiks und zur Bewertung der Bildqualität empfohlen. Für luftgetragenes Mikroplastik sind die Referenzverfahren diejenigen, die für Staub- und Partikelemissionen in der Arbeitsumgebung und in der Atmosphäre verwendet werden.

Siehe Verfahren für die Voruntersuchung in Abschnitt 7.

8.2 Zugabe des internen Standards

Für eine genauere Bestimmung der Faserform des Mikroplastiks in realen Proben kann ein interner Standard (synthetisches Filament) hinzugegeben werden. Dadurch wird es möglich, die Qualität aller Abläufe zu bestimmen, die zur Identifizierung der Faserform des Mikroplastiks führen. Der interne Standard sollte eine andere Farbe haben als die bei der Voruntersuchung festgestellte Farbe der Probe. Er sollte mit einer ähnlichen Konzentration hinzugegeben werden wie die in der Probe gezählte/geschätzte Partikelzahl.

8.3 Filtrieren

Jede vorbehandelte Probe wird mit der beschriebenen Vorrichtung vakuumfiltriert.

Zeigt die Probe auch nach der Vorbehandlung noch eine hohe Konzentration von Mikroplastik und suspendierten Feststoffen, erfolgt die Filtration in zwei getrennten Schritten:

- 1) Filtrieren des abgenommenen Überstands;
- 2) Filtrieren der Endablagerung (ausgefällt) mit Rückgewinnung durch letzten Waschvorgang.

Die Fasern des auf beiden Filtern gesammelten Mikroplastiks sind zu zählen und zu addieren, um das Endergebnis zu erhalten, das im abschließenden Prüfbericht anzugeben ist.

8.4 Rückgewinnungsverfahren und letzter Waschvorgang

Nach Abschluss der Filtrationsphase ist es notwendig, eine Rückgewinnungswäsche durchzuführen, um eventuelle Mikroplastikablagerungen am Boden des Kolbens/der Schaufel und von den Wänden der verwendeten Glasgeräte (sowohl Behälter als auch Filtrationssystem) zu entfernen.

Nach dem Filtrieren der gesamten Stammlösung werden die Trichterwände mit einer geringen Menge Waschlösung und einer Pasteur-Pipette aus Glas gewaschen, um die eventuell am Glas anhaftenden Mikropartikel zurückzugewinnen.

Der abschließende Waschgang (des Filtersystems, der Dichtung und des Kolbens mit der Stammlösung) zur Rückgewinnung wird mit einer Waschlösung durchgeführt und es wird auf dasselbe Filter filtriert.

Der Waschvorgang muss mindestens dreimal wiederholt werden, wobei jedes Mal ein Aliquot von 30 ml der Lösung für die Rückgewinnung zu verwenden ist. Für einen gründlichen Waschvorgang (des Filtertrichters, der Dichtung usw.) wird ein Aliquot des letzten Waschvorgangs mit einer Pasteur-Pipette aus Glas genutzt.

Die Waschlösung sollte aus den drei folgenden ausgewählt werden:

- 1 : 1 Wasser/Ethanol-Lösung;
- 1 % (m/V) Tensidlösung;
- 1 % (m/V) Natriumchloridlösung.

8.5 Bildanalyse

Das auf dem Filter gesammelte Mikroplastik wird einer Bildanalyse unterzogen, die manuell oder automatisch mithilfe von Software durchgeführt wird.

Die folgenden Informationen sind dabei zu sammeln:

- das Aussehen der Mikropartikel und die Faserform des Mikroplastiks;
- Identifizierung der Morphologie (Mikrofaser, Mikropartikel);
- Bestimmung der Maße Länge × Länge;
- X/Y-Mapping;
- Schätzung der Querschnittsfläche (Länge × Breite oder softwaregestützt);
- Schätzung der Außenfläche (kugelförmig, zylinderförmig (Rotationskörper) oder mit automatischer 3-D-Modellierung);
- Unterklassifizierung nach Farbe (sofern unterschiedlich), Morphologie und Abmessungen.

Bild 19 und Bild 20 zeigen Beispiele für die automatische Bildanalyse von auf Filtern gesammelten Partikeln.

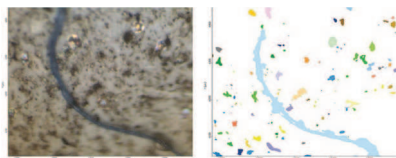


Bild 19 — Automatische Bildanalyse — Beispiel (1)

Length [µm]	Width [µm]	Aspect Ratio	Num Pixels	Area [µm²]	Convex Area [µm²]	Perimeter [µm]	Convex Perim. [µm]	Feret Max [µm]	Feret Min [µm]	CE Diam. [µm]	Circularity	Convexity	Solidity	SE Volume [µm³]
17.793	13.498	0.759	476.500	179.385	195.196	60.242	54.013	19.524	13.498	15.113	0.788	0.897	0.919	1807.352
5.640	5.206	0.923	58.500	22.023	22.964	18.135	17.652	6.136	4.909	5.295	0.917	0.973	0.959	77.747

Bild 20 — Automatische Bildanalyse — Beispiel (2) — Klassifizierung nach Abmessungen

8.6 Molekülspektroskopie (Schwingungsspektroskopie)

8.6.1 Festlegung der Gerätevoraussetzungen

Für die Identifizierung des Mikroplastiks dürfen die folgenden Techniken der Molekülspektroskopie angewendet werden:

- 1) Mikro-FTIR (für Mikroplastik bis 5 Mikrometer);

2) Mikro-Raman (für Mikroplastik von 0,2 Mikrometer bis 0,5 Mikrometer).

8.6.2 Nachweisgrenzen

Die Nachweisgrenzen der Verfahren hängen von den folgenden Faktoren ab:

- in Zusammenhang mit den Geräten:
 - Minimalgrößennachweis des Geräts (Mikro-FTIR oder Mikro-Raman);
 - prozentualer Anteil der Übereinstimmung beim chemischen Mapping;
 - Punkt der Analysedimension;
 - minimale X-Y-Verschiebungsschritte;
- in Zusammenhang mit der Morphologie des Mikroplastiks:
 - Form, Farbe;
- in Zusammenhang mit den Eigenschaften der Lösung:
 - Konzentration der Lösung: Anzahl der Partikel/Liter.

Eine hohe Anzahl der Partikel/Liter kennzeichnet eine Überlagerung des Mikroplastiks auf dem Filter und erhöht die Unsicherheit bei der Zählung und chemischen Identifizierung;
 - Größe des Filters und dessen Porengröße.

8.6.3 Berechnung der signifikanten Anzahl an Mikropartikeln für die Analyse

Da die Analysezeiten so kurz wie möglich gehalten werden müssen, ohne die Qualität der gewonnenen Daten zu beeinträchtigen, sind statistische Auswertungen durchzuführen, um die Mindestanzahl der zu analysierenden Partikel zu ermitteln, die für die Probe repräsentativ sein können.

Unter Bezugnahme auf eine aktuelle Veröffentlichung von *P.M Anger et al.* (1).

Die Berechnung der mindestens erforderlichen Partikelzahl basiert auf den folgenden Annahmen:

- alle auf dem Filter gesammelten Partikel werden in zwei Gruppen eingeteilt: Mikroplastik und keine Mikroplastik;
- alle auf dem Filter gesammelten Partikel werden voneinander getrennt;
- alle Partikel sind zufällig auf dem Filter verteilt, d. h., dass das Verhältnis zwischen Mikroplast und Nicht-Mikroplastik über das gesamte Filter konstant ist (keine Clusterbildung von Partikeln entsprechend ihren Eigenschaften);
- eine heterogene räumliche Verteilung der Partikel ist zulässig;
- alle Partikel werden durch Bilddatenverarbeitung identifiziert;
- alle Partikel werden unabhängig von ihrer Größe gleich behandelt und als einzelne Messpunkte betrachtet;
- einwandfreie Identifizierung von Partikeln durch analytische Verfahren (z. B. Molekülspektroskopie).

Die Autoren haben in der folgenden Gleichung den Algorithmus zur Bestimmung der signifikanten Anzahl der Partikel identifiziert.

$$n \geq \frac{P(1-P)}{\frac{e^2}{\sigma^2} + \frac{P(1-P)}{N}} \quad (1)$$

mit:

σ -Wert für das Vorhersageintervall	$\sigma = 1,65$ für 90 %-Vorhersageintervall [68]
Gesamtzahl der durch Bilddatenanalyse auf dem Filter festgestellten Partikel	N
Schätzwert für den Anteil an Mikroplastik	P /Dezimal
Unsicherheitsgrenze	e /Dezimal
Probenumfang/erforderliche Anzahl an Partikeln	

Verweisung:

(1) P. M. Anger, E. von der Esch, T. Baumann, M. Elsner, R. Niessner, N. P. Ivleva *Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis. Trends in Analytical Chemistry 2018, 109 214-226. J.C. Myers, Normal Distribution Function, Geostatistical Error Managment*

8.6.4 Gerätevoraussetzungen für Mikro-FTIR: Identifizierung des Mikroplastiks

Mit dem Infrarotmikroskop können Proben bis zu einer Größe von 50 Mikrometer bei geringen Betriebskosten analysiert werden.

Um Materialien (Mikroplastik) kleiner als 10 Mikrometer zu identifizieren, muss die Auflösung und die Analyseleistung mithilfe eines durch Flüssigstickstoff gekühlten MCT-Detektors (Quecksilber-Cadmium-Tellurid) erhöht werden.

Anhand der mithilfe der Bildanalyse-Software ermittelten Partikelgröße wird die optimale Öffnung der Filter eingestellt, dann werden die Spektren einschließlich der Hintergrundspektren gesammelt, der Hintergrund von den gemessenen Spektren der einzelnen Partikel subtrahiert und anschließend das resultierende Spektrum mit den Bibliotheken verglichen. Die Partikelanalyse wird vereinfacht, indem die Identifizierung des Materials, die Größe, der prozentuale Verteilungsgrad und das chemische Bild der Partikel innerhalb eines Bereichs ermittelt werden.

Bei jeder der verschiedenen Analysearten (Reflexion, Transmission und Mikro-ATR) werden spezielle Datenbanken mit den IR-Spektren des Mikroplastiks angelegt. Je nach durchgeführter Analyseart wird das am besten geeignete Filter ausgewählt (Aluminiumoxid, Silizium, goldbeschichtetes Polycarbonat).

ATR-Kristalle, die größer sind als die Breite der zu analysierenden Partikel, können nicht für die ATR-FTIR-Analyse genutzt werden.

Bild 21 zeigt Beispiele für Mikroplastik, das auf Siliziumfiltern gesammelt und mithilfe von Mikro-FTIR im Transmissionsmodus chemisch identifiziert wurde.

Bild 22 zeigt Beispiele für Mikroplastik, das auf goldbeschichteten Polycarbonatfiltern gesammelt und mithilfe von Mikro-FTIR im Reflexionsmodus chemisch identifiziert wurde.

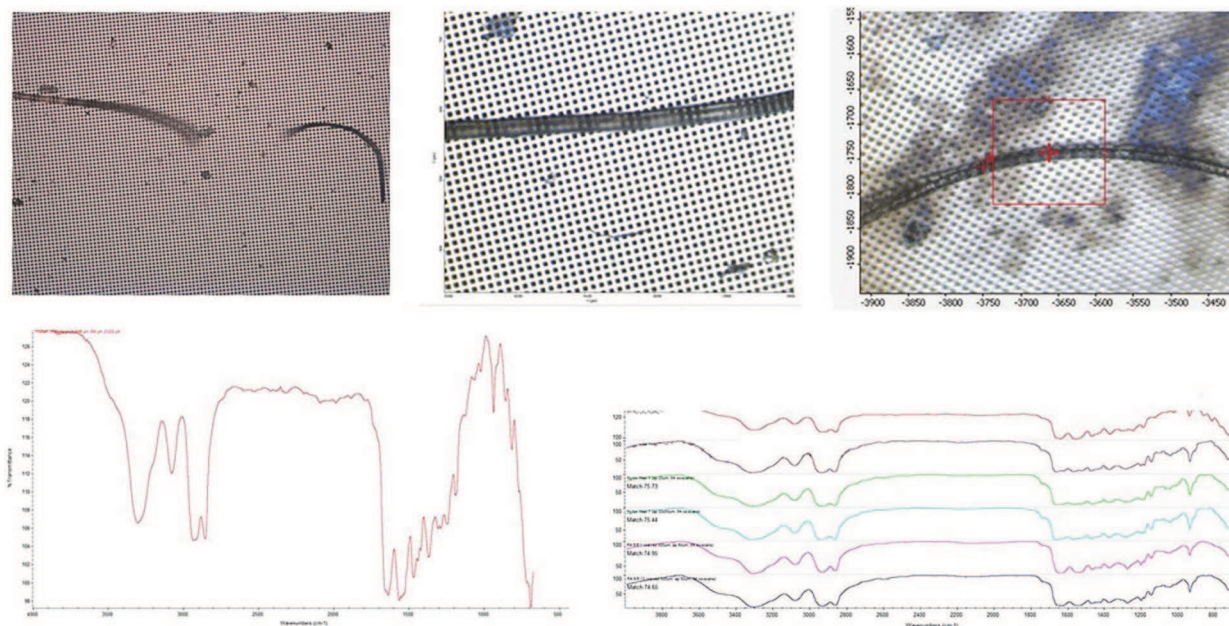


Bild 21 — Beispiele für die Spektren von Mikroplastik, die mithilfe von Mikro-FTIR im Transmissionsmodus auf Siliziumfiltern erhalten wurden

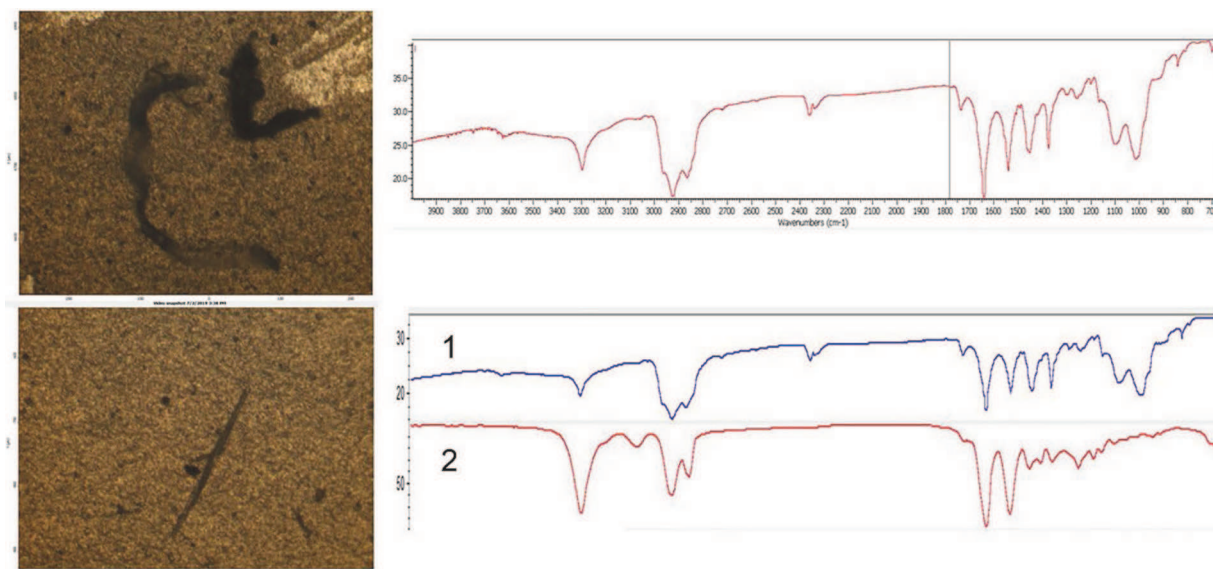


Bild 22 — Beispiele für die Spektren von Mikroplastik, die mithilfe von Mikro-FTIR im Reflexionsmodus auf goldbeschichteten Polycarbonatfiltern erhalten wurden

8.6.5 Gerätevoraussetzungen für Mikro-Raman: Identifizierung des Mikroplastiks

Bei der Raman-Spektroskopie wird die Probe mit monochromatischem Licht, üblicherweise einem Laser, bestrahlt. Einige Photonen werden anelastisch gestreut und liefern damit Informationen über die Molekülschwingungen der Probe; die erhaltenen Spektren dürfen mit Referenzdatenbanken verglichen werden. Bei Mikro-Raman liegt die Ortsauflösung bei 200 nm und damit liegt der Grenzwert für die Partikel unter einem Mikrometer. Diese Technik ist unempfindlich gegenüber Wasser und erfordert daher keinen Vortrocknungsprozess.

Ein Nachteil ist die Analysezeit, die je nach untersuchtem Bereich sehr lang sein kann, und der Störeinfluss durch fluoreszierende Substanzen, was sich auf die Wahl der Laserwellenlänge, die Leistung, die Messzeit und die geeigneten optischen Parameter auswirkt.

Bei jeder Analyse ist es möglich, Partikelverunreinigungen auf einer Probenoberfläche schnell und einfach zu finden, zu klassifizieren, zu quantifizieren und zu identifizieren.

In Abhängigkeit von der verwendeten Software ist es auch möglich, Folgendes zu ermitteln:

- chemische 3-D-Charakterisierung der Partikel;
- Übersicht über die chemische Zusammensetzung von heterogenen Proben kleiner als ein Mikrometer;
- morphologische und chemische Zusammensetzung jedes Partikels;
- kombinierte Informationen über die Partikelzusammensetzung und Größenverteilung;
- Extrapolation der Grundgesamtheit N .

Ein Vorteil der Mikro-FTIR- und/oder Mikro-Raman-Identifizierung von Mikroplastik ist das Vermeiden von Überschätzungen aufgrund des möglichen Vorhandenseins von nichtplastischem Material, wie z. B. Zellulosefasern, in der Probe.

Bild 23 zeigt ein Beispiel für Raman-Spektren und vergrößerte Videoausschnitte von Polypropylenfasern.

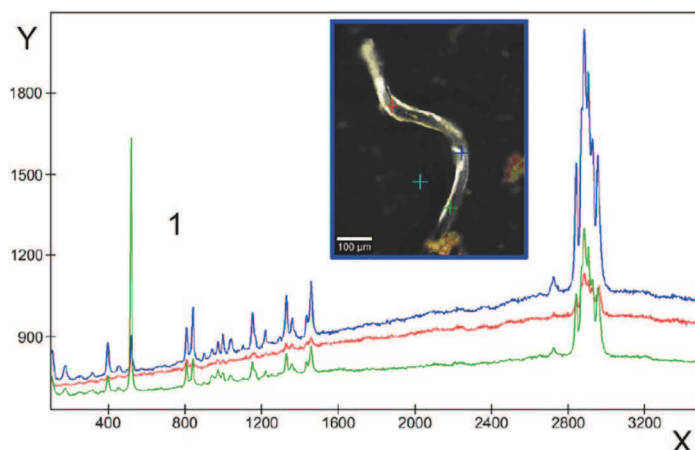


Bild 23 — Raman-Spektren und vergrößerte Videoausschnitte von Polypropylenfasern

8.6.6 Vergleichen von Spektren und Identifizierung des Mikroplastiks

Wenn weder bei FTIR noch bei Raman das Spektrum nicht mit einer Übereinstimmung von mehr als 75 % erkannt wird, wird das entsprechende Partikel mit „unbekannter Zusammensetzung“ angezeigt.

Der Abgleich dieser Spektren mit der Spektren-Datenbank (Spektren-DB) wird für alle kartierten Punkte oder für eine statistisch repräsentative Probe davon (n) für jede Klasse der morphologischen Abmessungen durchgeführt.

Die Spektren-Datenbanken sind kommerzielle oder intern erstellte Datenbanken, die auf bekannten Mikroplastik-Proben basieren. Dabei ist es möglich, Spektren-Datenbanken mit Mikroplastik-Proben aus verschiedenen Umgebungen zu erstellen.

Für eine automatische Raman-Identifizierung müssen gute Übereinstimmungen von 90 % oder höher vorliegen. Bei niedrigeren Werten wird die Partikelidentifizierung mithilfe von kundenspezifischen Datenbanken durchgeführt.

8.6.7 Abschätzung der Außenfläche und des Volumens

Die Oberfläche, das Volumen und die Morphologie könnten automatisch ermittelt werden, sofern eine spezielle Software verfügbar ist.

Falls nicht, kann die Abschätzung unter der Annahme, dass die Partikel kugelförmig (1) und die Fasern (2, 3) zylindrisch sind, manuell erfolgen.

Verweisungen

(1) Claus G. Bannick, Umweltbundesamt (UBA), Berlin, Deutschland *Sampling, Sample Preparation and Detection of Microplastic, current activities in the ISO/TC 61/SC 14/WG 4*

(2) F. de Falco, E. Di Pace, M. Cocca und M. Avella *The contribution of washing processes of synthetic clothes to microplastic pollution*, Scientific Report (2019)

(3) Napper IE, Thompson RC. *Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions*. Mar Pollut Bull. 2016; 112: 39-45.

8.6.8 Berechnung der Gesamtfläche und Gesamtmasse

Für jede Polymerfamilie, die durch Molekülspektroskopie erkannt wird, müssen folgende Schritte unternommen werden:

- Addieren der berechneten/geschätzten Oberflächenwerte je Polymerfamilie;
- Berechnen der Volumen der identifizierten Partikel (kugelförmig, zylinderförmig (Rotationskörper) oder mit automatischer 3-D-Modellierung);
- Addieren der berechneten/geschätzten Massewerte je Polymerfamilie;
- Berechnen der Gesamtmasse je Polymertyp (ausgehend von Volumen und Dichte, die für das betrachtete Polymer typisch sind) mit folgender Gleichung:

$$P = V \times d$$

Dabei ist

- P die geschätzte Gesamtmasse;
- V das geschätzte Gesamtvolumen;
- d die relative Dichte der Hauptpolymere.

Tabelle 6 — Dichtewerte einiger synthetischer Polymere

Chemische Bezeichnung	Dichte (g/ml)
Polypropylen, ataktisch	0,866
Polypropylen, isotaktisch	0,90
Polyisopren	0,906
Polyethylen, niedriger Dichte	0,92
Polyethylen, hoher Dichte	0,95
Polydimethylsiloxan	0,970
Polystyren	1,050
Nylon 6.6 [Poly(hexamethylenadipamid)]	1,08
Nylon 6 [Polycaprolactam]	1,12
Polyvinylacetat	1,190
Polycarbonat	1,200
Polyvinylalkohol	1,29
Polyacrylamid	1,302
Polybutylenterephthalat	1,31
Celluloseacetat	1,31
Polyethylenterephthalat	1,385
Polyvinylchlorid	1,40
Cellulosenitrat	1,60
Polyvinylidenfluorid	1,76
Polytetrafluorethylen	2,00

8.6.9 Berechnung der Rückgewinnungsrate (Rr) für die ZÄHLUNG

Bei Hinzugabe des internen Standards wird der Wert des rückgewonnenen Mikroplastiks (interner MP-Standard) bei der Probenanalyse bestimmt und das Rückgewinnungsverhältnis mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$Rr = \frac{Recog. IS MP}{Th. IS MP ad.}$$

Dabei ist

Rr die Rückgewinnungsrate;

Recog. IS MP die Anzahl der erkannten internen MP-Standards;

Th. IS MP ad. die theoretische Anzahl der hinzugegebenen internen MP-Standards.

9 Prüfbericht

Der Prüfbericht enthält:

- 1) eine zusammenfassende Tabelle mit:
 - den Klassifizierungen nach Morphologie und Abmessungen;
 - der Anzahl, den Typen und den Farben der festgestellten Polymere;
 - dem geschätzten Oberflächenbereich (angegeben in mm²/Einheit der analysierten Probe) je identifizierter Polymerfamilie;
 - der geschätzten Masse (angegeben in mg/Einheit der Probe) je identifizierter Polymerfamilie.

Für die Klassifizierungen nach Größe gelten die folgenden nach ISO/TR 21960 [7] definierten Werte:

**5 000 µm bis 1 000 µm, < 1 000 µm bis 500 µm, < 500 µm bis 100 µm, < 100 µm bis 50 µm,
< 50 µm bis 10 µm, < 10 µm bis 5 µm, < 5 µm bis 1 µm. < 1 µm bis 0,1 µm**

Der Bericht darf außerdem Folgendes enthalten:

- 2) die Rückgewinnungsrate;
- 3) Photographien der Proben;
- 4) mithilfe des Lichtmikroskops erstellte Bilder;
- 5) Bilder des Partikel-Mappings;
- 6) Spektren;
- 7) Zusammenfassungen und graphische Darstellungen der verschiedenen identifizierten Klassen:
 - nach Morphologie;
 - nach Abmessungen;
 - nach Polymerfamilien.

9.1 Beispiel für einen Prüfbericht für Mikroplastik

Bild 24 zeigt ein Beispiel für die manuelle Klassifizierung mit einem Lichtmikroskop anhand von Durchmesser und Länge von Mikroplastik, das auf einem Cellulosefilter gesammelt wurde.

Bild 25 zeigt ein Beispiel für eine automatische Bildanalyse mit Mikro-FTIR von Mikroplastik, das auf einem Siliziumfilter gesammelt wurde. Klassifizierung des Mikroplastiks anhand seiner Polymergruppe, Positionskoordinaten, Abmessungen und Fläche usw.