

Glyphosat – Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Urin mittels GC-MS/MS

Biomonitoring-Methode

H.-W. Hoppe¹
U. Fest¹
E. Eckert²
J. Müller²

T. Göen^{3,*}
A. Hartwig^{4,*}
MAK Commission^{5,*}

Keywords

Glyphosat; AMPA;
Biomonitoring; Urin; GC-MS/MS

- ¹ Methodenentwicklung, MVZ Medizinisches Labor Bremen GmbH, Haferwende 12, 28357 Bremen
- ² Methodenprüfung, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen
- ³ Methodenprüfung, Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen
- ⁴ Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe
- ⁵ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn, Germany

* E-Mail: T. Göen (thomas.goeen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area developed and verified the presented biomonitoring method. Glyphosate (*N*-phosphonomethylglycine) is a synthetic phosphonic acid derivative which has been used as a broad-spectrum herbicide since 1974. Its only known metabolite is aminomethylphosphonic acid (AMPA). Exposure in occupational settings is predominantly due to inhalation and dermal contact with glyphosate. The general population is exposed to glyphosate and AMPA via both dietary (plant and animal products) and environmental (soils, surface water, and groundwater) exposure.

The aim of this work was to develop a selective method for the determination of glyphosate and AMPA in urine. The method has been comprehensively validated, and the reliability data have been confirmed by replication and verification of the procedure in a second, independent laboratory. The analytes are directly derivatised in the dried urine sample with trifluoroacetic anhydride and trifluoroethanol without an initial extraction step. Calibration is performed using aqueous calibration standards processed analogously to the samples. As internal standards, glyphosate- d_2 and $^{13}C,^{15}N$ -AMPA are added to the urine samples and calibration standards. The derivatives are measured after capillary gas-chromatographic separation with tandem mass-spectrometric detection (GC-MS/MS) using negative chemical ionisation (NCI).

The good precision and accuracy data show that the method provides reliable and accurate analytical results. The method is both selective and sensitive, and the quantitation limit of 0.1 µg/l urine for glyphosate and AMPA is sufficient to determine occupational exposure as well as higher background levels in the general population.

Citation Note:

Hoppe H-W, Fest U, Eckert E, Müller J, Göen T, Hartwig A, MAK Commission.
Glyphosat – Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Urin mittels GC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2023 Jun;8(2):Doc051. https://doi.org/10.34865/bii07183d8_2or

Manuskript abgeschlossen:
29 Okt 2020

Publikationsdatum:
30 Jun 2023

Lizenz: Dieses Werk ist
lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](#).



1 Kenndaten der Methode

Matrix Urin
Analytisches Messprinzip Gaschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS)

Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Glyphosat (N-Phosphonomethylglycin)	1071-83-6		
Kaliumglyphosat	70901-12-1; 39600-42-5		
Natriumglyphosat	34494-03-6		
Glyphosatnatriumsalz (2:3)	70393-85-0		
Ammoniumglyphosat	40465-66-5	Glyphosat	1071-83-6
Diammoniumglyphosat	69254-40-6	Aminomethylphosphonsäure	1066-51-9
Triammoniumglyphosat	114370-14-8		
Dimethylammoniumglyphosat	34494-04-7		
Ethanolammoniumglyphosat	40465-76-7		
Isopropylammoniumglyphosat	38641-94-0		
Trimethylsulfoniumglyphosat	81591-81-3		

Zuverlässigkeitskriterien

Glyphosat

Präzision in der Serie: Standardabweichung (rel.) $s_w = 9,13\%$, 2,68 %, 2,70 % bzw. 4,74 %
 Streubereich $u = 20,7\%$, 6,06 %, 6,11 % bzw. 10,7 %
 bei einer dotierten Konzentration von 0,1 µg, 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 5,0 µg Glyphosat pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen

Präzision von Tag zu Tag: Standardabweichung (rel.) $s_w = 5,15\%$ bzw. 3,35 %
 Streubereich $u = 11,1\%$ bzw. 7,19 %
 bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg bzw. 2,5 µg Glyphosat pro Liter Urin und n = 15 Bestimmungen

Richtigkeit: Wiederfindungsrate (rel.) $r = 95,0\%$, 96,9 % bzw. 101 %
 bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg, 2,5 µg bzw. 5,0 µg Glyphosat pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen

Nachweisgrenze: 0,03 µg Glyphosat pro Liter Urin

Bestimmungsgrenze: 0,1 µg Glyphosat pro Liter Urin

AMPA

Präzision in der Serie: Standardabweichung (rel.) $s_w = 8,91\%$, 4,37 %, 2,70 % bzw. 2,41 %
 Streubereich $u = 20,2\%$, 9,88 %, 6,11 % bzw. 5,45 %
 bei einer dotierten Konzentration von 0,1 µg, 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 5,0 µg AMPA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen

Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg bzw. 2,5 µg AMPA pro Liter Urin und n = 15 Bestimmungen	$s_w = 4,32\%$ bzw. $3,03\%$ $u = 9,27\%$ bzw. $6,50\%$
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 0,5 µg, 2,5 µg bzw. 5,0 µg AMPA pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen	$r = 95,0\%$, $98,3\%$ bzw. 106%
Nachweisgrenze:	0,03 µg AMPA pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,1 µg AMPA pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu Glyphosat und AMPA

Glyphosat (Strukturformel siehe [Abbildung 1](#)) ist eine chemische Verbindung aus der Gruppe der Phosphonsäurederivate und wurde 1950 erstmalig von der Cilag AG, einem Schweizer Pharmaunternehmen, synthetisiert. Der Konzern MONSANTO erkannte die biologische Aktivität der Substanz, erlangte 1974 das Patent als Breitbandherbizid und brachte Glyphosat als Wirkstoff von Roundup® im gleichen Jahr auf den Markt (Dill et al. 2010). Glyphosat entwickelte sich in der Folgezeit zum Wirkstoff mit dem weltweit höchsten Produktionsvolumen zur Unkrautbekämpfung im landwirtschaftlichen Sektor, im Gartenbau, im Weinbau und zur Sikkation (Dill et al. 2010; Duke und Powles 2008; Jaworski 1972). Darüber hinaus kommt es in der Forstwirtschaft, an Bahntrassen und Straßenrändern, auf öffentlichen Grünflächen und in privaten Gärten zum Einsatz.

Glyphosat hemmt im Shikimatweg spezifisch das Enzym 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS), das nur in Pflanzen vorkommt und für die Biosynthese der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan essenziell ist. Auf diese Weise wird die Proteinbiosynthese gehemmt und die Pflanze stirbt kurz nach der Glyphosat-Aufnahme ab (Dill et al. 2010; Jaworski 1972).

Glyphosat wird zumeist in Form seiner Salze vermarktet. In [Tabelle 1](#) sind die in den Herbizidprodukten am häufigsten als aktive Substanzen verwendeten Salze zusammengestellt.

Tab. 1 Glyphosatsalze, die als Wirkstoffe in Glyphosatformulierungen eingesetzt werden (nach ATSDR 2020)

Substanz	CAS-Nr.	Kation
Kaliumglyphosat	70901-12-1; 39600-42-5	K ⁺
Natriumglyphosat	34494-03-6	Na ⁺
Glyphosatsnatriumsalz (2:3)	70393-85-0	Na ⁺
Ammoniumglyphosat	40465-66-5	NH ₄ ⁺
Diammoniumglyphosat	69254-40-6	NH ₄ ⁺
Triammoniumglyphosat	114370-14-8	NH ₄ ⁺
Dimethylammoniumglyphosat	34494-04-7	NH ₂ (CH ₃) ₂ ⁺
Ethanolammoniumglyphosat	40465-76-7	NH ₃ (CH ₂ CH ₂ OH) ⁺
Isopropylammoniumglyphosat	38641-94-0	NH ₃ CH(CH ₃) ₂ ⁺
Trimethylsulfoniumglyphosat	81591-81-3	S(CH ₃) ₃ ⁺

Der globale Glyphosatverbrauch beträgt ca. 800 000 t pro Jahr, in Europa werden 7% davon ausgebracht. 90% des weltweit produzierten Glyphosats werden in der Landwirtschaft eingesetzt (Antier et al. 2020), der Großteil davon außerhalb Europas beim Anbau genetisch veränderter, glyphosatresistenter Pflanzen (Transparency Market Research 2014). In Deutschland reduzierten sich die Verkaufszahlen von ca. 7600 t im Jahr 2008 auf 4400 t im Jahr 2017 (Antier et al. 2020).

Von Versuchstieren werden 20 % (19–34 %) einer oral verabreichten Glyphosatdosis mit dem Urin ausgeschieden (EFSA 2015 a; IARC 2017). Neuere Probandenstudien (Zoller et al. 2020) deuten jedoch auf eine deutlich geringere Ausscheidung von ca. 1 % hin. Im Säugetierorganismus wird Glyphosat nur in sehr geringem Maße metabolisiert. Der einzige bekannte Metabolit, AMPA (Strukturformel siehe [Abbildung 1](#)), macht weniger als 1 % der verabreichten Glyphosatdosis aus. Resorbiertes Glyphosat wird innerhalb von sieben Tagen nahezu vollständig (99 %) mit dem Urin ausgeschieden und zeigt kein Potential zur Akkumulation. Die Eliminationskinetik ist biphasisch mit einer schnelleren (Halbwertszeit 2,1–7,5 h) und einer langsameren Phase (Halbwertszeit 69–337 h) (EFSA 2015 a).

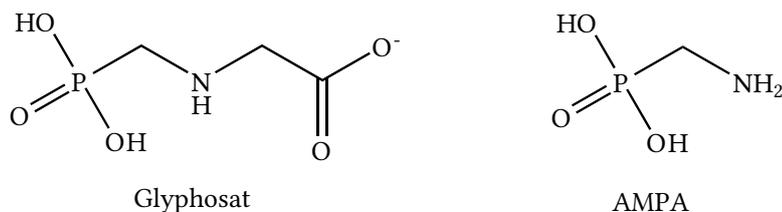


Abb. 1 Strukturformeln von Glyphosat und AMPA

Das Hauptabbauprodukt von Glyphosat in Pflanzen und in der Umwelt ist ebenfalls AMPA. Dementsprechend finden sich Glyphosat und AMPA nicht nur häufig als Rückstände in Getreide, Soja und anderen Nutzpflanzen nach Behandlung mit Roundup®, sondern werden auch in Böden, Oberflächenwasser und Grundwasser nachgewiesen (Borggaard und Gimsing 2008). Eine Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung mit Glyphosat und AMPA kann somit sowohl aus der Ernährung als auch aus einer Umweltsituation resultieren. Die Korrelation der Glyphosat- und AMPA-Konzentrationen in Humanurin ist in der Regel gering. Dies wird so interpretiert, dass AMPA im Urin unspezifisch exponierter Personen sekundär aus Lebensmitteln stammt (EFSA 2015 a, b) und nicht aus metabolisiertem Glyphosat. Zudem zeigen Studien, dass AMPA in der Umwelt nicht nur durch mikrobiellen Abbau von Glyphosat, sondern auch durch mikrobiellen und photochemischen Abbau verschiedener Aminophosphonsäuren (als Bestandteil von Industriechemikalien, Flammenschutzmitteln und Tensiden) entsteht (Grandcoin et al. 2017; Struger et al. 2015). Diese Prozesse können in Verbindung mit dem eher langsamen Abbau von AMPA in der Umwelt zu dessen Anreicherung in pflanzlichen und tierischen Produkten führen (Van Bruggen et al. 2018).

Eine Reihe von Human-Biomonitoring (HBM)-Studien haben die Hintergrundbelastung mit Glyphosat und AMPA untersucht und deuten auf eine Exposition der Allgemeinbevölkerung hin, wobei in der Mehrzahl der Proben sehr geringe Gehalte im Bereich der Bestimmungsgrenzen gefunden wurden. Exemplarisch sind in [Tabelle 2](#) die Ergebnisse von drei Studien aus Deutschland dargestellt, die auf GC-MS/MS- und LC-MS/MS-Messungen beruhen und orientierend die Größenordnung aufzeigen, in der die Allgemeinbevölkerung mit Glyphosat und AMPA belastet ist.

Tab. 2 Glyphosat- und AMPA-Konzentrationen in Urinproben der deutschen Allgemeinbevölkerung

Kollektiv (Personenanzahl)	Analytische Methode	Analyt	BG [µg/l]	Konzentration [µg/l]		Nachweishäufigkeit [%]	Literatur
				Median	Maximum		
KarMeN-Studie, Erwachsene (301), 24-h-Urin	LC-MS/MS	Glyphosat	0,2	< BG	1,36	8,3	Soukup et al. 2020
		AMPA	0,2	< BG	1,53	8,3	
Proben der Umweltprobenbank, 20–29 a (399 Proben), 24-h-Urin	GC-MS/MS	Glyphosat	0,1	< BG–0,18 ^{a)}	0,11–2,80 ^{a)}	10–57,5	Conrad et al. 2017
		AMPA	0,1	< BG–0,18 ^{a)}	0,18–1,88 ^{a)}	15–60	
Kinder, 2–6 a (250 Proben), Spontanurin	GC-MS/MS	Glyphosat	0,1	0,14 ^{b)}	3,7	63	LANUV 2016
		AMPA	0,1	0,13 ^{b)}	2,2	58	

BG: Bestimmungsgrenze

^{a)} Werte der Jahre 2001–2015

^{b)} Werte < BG flossen mit halbem Wert der BG in die Berechnung ein

In aktuellen Reviews werden umfangreiche Biomonitoringdaten für Glyphosat und zum Teil auch für AMPA in europäischen und außereuropäischen Ländern zusammengefasst und diskutiert. Nach Gillezeau et al. (2019) liegt die mittlere Glyphosatkonzentration im Urin der Allgemeinbevölkerung zwischen 0,16 und 4 µg Glyphosat/l, wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen groß sind. Insbesondere in Regionen, in denen glyphosathaltige Herbizide mit dem Flugzeug versprüht werden, steigt die Glyphosatkonzentration im Mittel auf 7,6 µg/l an (Gillezeau et al. 2019; Varona et al. 2009). Niemann et al. (2015) verglichen Glyphosat-Uringehalte aus sieben Studien in Europa und den USA. Die Maximalwerte der Landwirte und ihrer Familien lagen bei 9,5 bis 233 µg/l, die der Stadtbewohner bei 0,65 bis 18,8 µg/l. Zur Vergleichbarkeit muss einschränkend angemerkt werden, dass diesen Daten Analysenmethoden unterschiedlicher Sensitivität zugrunde lagen.

Die Exposition im beruflichen Umfeld beruht überwiegend auf inhalativem und dermale Kontakt mit Glyphosat. Tabelle 3 zeigt beispielhaft die Daten von fünf Arbeitsplatzstudien (Waldarbeiter, Landwirte, Landschaftsgärtner), die im Review von Gillezeau et al. (2019) ausgewertet wurden. Die mittleren Glyphosatgehalte (oberhalb der Nachweisgrenze) variierten von 0,26 bis 73,5 µg/l Urin. Der Maximalwert betrug 233 µg/l bei einem Landwirt und seiner Familie (Acquavella et al. 2004). Zhang et al. (2020) berichteten über eine Biomonitoringstudie in einer Fabrik in Ost-China, die Glyphosat produziert. Von Beschäftigten aus verschiedenen Produktionsbereichen (Kristallisation, Zentrifugation, Trocknung und Verpackung) wurden 134 Urinproben untersucht. Die Glyphosat- und AMPA-Gehalte betragen < 20–17 200 µg/l bzw. < 10–2730 µg/l. Die Luftkonzentrationen am Arbeitsplatz korrelierten gut mit den Gehalten in den Urinproben.

Tab. 3 Glyphosat- und AMPA-Konzentrationen in Urinproben von Beschäftigten

Kollektiv (Personenanzahl)	Analytische Methode	Analyt	NWG [µg/l]	Konzentration [µg/l]		Nachweis- häufigkeit [%]	Literatur
				Geometrischer Mittelwert (Bereich)	GSD		
Landwirte, Probenahme am Anwendungstag (48)	HPLC mit Nachsäulen- reaktion und Fluoreszenzdetektion	Glyphosat	1	3,2 (1–233)	6,4	60	Acquavella et al. 2004
Landwirte (76)	ELISA	Glyphosat	0,05	0,334 (0,064–0,875)	–	68,4	Rendon-von Osten und Dzul-Caamal 2017
Landschaftsgärtner, nach Anwendung (17)	LC-MS/MS	Glyphosat	0,5	0,66	1,11	–	Connolly et al. 2017
Landschaftsgärtner, nach Anwendung (20)	LC-MS/MS	Glyphosat	0,5 ^{a)}	1,17	–	–	Connolly et al. 2018
Beschäftigte einer Glyphosat-produzierenden Firma (134)	GC-MS	Glyphosat	20	262 (20–17 202)	–	86,6	Zhang et al. 2020
		AMPA	10	72 (10–2730)	–	81,3	

GSD: geometrische Standardabweichung; NWG: Nachweisgrenze

^{a)} Bestimmungsgrenze

Die akute Toxizität von Glyphosat ist gering. Von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) wurde auf Basis der Entwicklungstoxizität ein ADI-Wert (*Acceptable Daily Intake*, zulässige tägliche Aufnahmemenge) von 0,5 mg Glyphosat/kg Körpergewicht und Tag abgeleitet. Da AMPA und Glyphosat ähnliche toxikologische Profile aufweisen, werden für AMPA die Glyphosat-Beurteilungswerte zugrunde gelegt (EFSA 2015 a). Glyphosat wurde durch die Internationale Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) als wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen (Gruppe 2A) eingestuft (IARC 2017). Andere Expertengremien kommen dagegen zu dem Schluss, dass bei bestimmungsgemäßer Anwendung kein kanzerogenes Risiko für den Menschen zu erwarten ist (ECHA 2017, 2022; EFSA 2015 b). Die Diskussion über eine mögliche Kanzerogenität und über andere gesundheitliche Risiken (Teratogenität und hormonelle Störungen) ist noch nicht abgeschlossen (US EPA 2017; Van Bruggen et al. 2018). Von der Kommission wurde Glyphosat noch nicht bewertet.

3 Grundlage des Verfahrens

Glyphosat und sein Metabolit AMPA werden in der eingeeengten Urinprobe ohne Extraktionsschritt direkt mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) und Trifluorethanol (TFE) derivatisiert. Die Kalibrierung erfolgt mit wässrigen Standards, die in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Glyphosat-d₂ und ¹³C,¹⁵N-AMPA werden als interne Standards (ISTDs) den Urinproben und den Kalibrierstandards zugesetzt. Die Messung der Derivate erfolgt mit GC-NCI-MS/MS.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- Gaschromatograph mit Autosampler, Split/Splitlos-Aufgabesystem und tandem-massenspektrometrischem Detektor sowie mit Datensystem zur Auswertung (z.B. Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Kapillargaschromatographische Säule (Länge: 30 m; Innendurchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 µm; stationäre Phase: Polyethylenglykol) (z.B. HP INNOWax, Nr. 19091N-133, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Liner (z.B. Topaz 4-mm Single Taper Liner mit Wolle, Nr. 23303.5, Restek GmbH, Bad Homburg vor der Höhe)
- Analysenwaage (z.B. Sartorius AG, Göttingen)
- Heizblock mit Bohrungen für Probenfläschchen (z.B. Barkey GmbH & Co. KG, Leopoldshöhe)
- Laborzentrifuge (z.B. Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)
- Vortex-Mischer (z.B. Multi-Tube Vortexer, VWR International GmbH, Darmstadt)
- Vakuumzentrifuge (z.B. Jouan GmbH, Unterhaching)
- Handdispenser für die Zugabe von 10 µl, 20 µl, 25 µl, 50 µl und 100 µl (z.B. Multipette[®], Eppendorf AG, Hamburg)
- 10-ml-Messkolben (z.B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 2-ml-Autosampler-Vials (z.B. Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- 250-µl-Mikro-Inserts (z.B. Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- 10-ml-Polypropylenröhrchen (z.B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- 2-ml-Reaktionsgefäße (z.B. Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg)
- 10-ml-Schraubgläser (Borosilikat) mit Teflondichtung (z.B. SCHOTT AG, Mainz)
- Variable Kolbenhubpipetten (0,5–10 µl, 10–100 µl und 100–1000 µl) (z.B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Urinbecher (z.B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Urin-Monovetten[®] (z.B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

4.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, sind alle genannten Chemikalien mindestens in p. a.-Qualität zu verwenden.

- Acetonitril (z.B. Nr. 11317080, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Methanol (z.B. Nr. 136806, Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande)
- Trifluoressigsäureanhydrid, 99 % (z.B. Nr. 91719, Merck KGaA, Darmstadt)
- 2,2,2-Trifluorethanol, 99 % (z.B. Nr. T63002, Merck KGaA, Darmstadt)

- Aminomethylphosphonsäure (AMPA), 10 µg/ml in Wasser (z. B. Nr. L10205000WA, Dr. Ehrenstorfer™, LGC Standards GmbH, Wesel)
- ¹³C,¹⁵N-Aminomethylphosphonsäure (¹³C,¹⁵N-AMPA), 100 µg/ml in Wasser (z. B. Nr. XA10205100WA, Dr. Ehrenstorfer™, LGC Standards GmbH, Wesel)
- Glyphosat, 10 µg/ml in Wasser (z. B. Nr. L14050000WA, Dr. Ehrenstorfer™, LGC Standards GmbH, Wesel)
- Phosphonomethyl-d₂-glycin (Glyphosat-d₂); Reinsubstanz, 99 % Isotopenreinheit (z. B. Nr. D-8030, C/D/N Isotopes, Pointe-Claire, Kanada)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q® Direct Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)

4.3 Interne Standards (ISTDs)

- Glyphosat-d₂ Stammlösung (1000 mg/l)
10 mg Glyphosat-d₂ werden in einen 10-ml-Messkolben exakt eingewogen, mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt, umgeschwenkt und die Lösung in ein 10-ml-Polypropylenröhrchen überführt.
- ISTD-Arbeitslösung (10 mg/l)
In einen 10-ml-Messkolben, in den etwas hochreines Wasser vorgelegt wurde, werden 100 µl der Glyphosat-d₂-Stammlösung und 1 ml der ¹³C,¹⁵N-AMPA-Lösung pipettiert. Anschließend wird der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt, umgeschwenkt und die Lösung in ein 10-ml-Polypropylenröhrchen überführt. Die Endkonzentrationen an Glyphosat-d₂ und ¹³C,¹⁵N-AMPA betragen jeweils 10 mg/l.

Bei -18 °C beträgt die verlustfreie Lagerungszeit 12 Monate.

- ISTD-Dotierlösung (0,01 mg/l)
In ein 10-ml-Polypropylenröhrchen werden etwa 5 ml hochreines Wasser vorgelegt, 10 µl der ISTD-Arbeitslösung zugegeben und mit hochreinem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Die Endkonzentrationen für Glyphosat-d₂ und ¹³C,¹⁵N-AMPA betragen jeweils 0,01 mg/l.

Bei Lagerung bei 2–8 °C sind Glyphosat-d₂ und ¹³C,¹⁵N-AMPA in der ISTD-Dotierlösung mindestens vier Wochen stabil. Bei -18 °C beträgt die verlustfreie Lagerungszeit 12 Monate.

4.4 Kalibrierstandards

- Dotierlösung I (0,05 mg/l)
In einen 10-ml-Messkolben, in dem etwas hochreines Wasser vorgelegt wurde, werden je 50 µl der Standardlösungen für Glyphosat (10 mg/l) und AMPA (10 mg/l) pipettiert. Anschließend wird der Kolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt und die Lösung in ein 10-ml-Polypropylenröhrchen überführt. Die Endkonzentrationen für Glyphosat und AMPA betragen jeweils 0,05 mg/l.

Bei Lagerung bei 2–8 °C sind Glyphosat und AMPA in der Dotierlösung I mindestens vier Wochen stabil. Bei -18 °C beträgt die verlustfreie Lagerungszeit 12 Monate.

- Dotierlösung II (0,005 mg/l)
In ein 2-ml-Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tube) werden zu 450 µl hochreinem Wasser 50 µl der Dotierlösung I pipettiert. Die Endkonzentrationen für Glyphosat und AMPA betragen jeweils 0,005 mg/l.

Die Dotierlösung II wird arbeitstäglich frisch angesetzt.

Die Kalibrierstandards werden in Glasfläschchen, in denen 1 ml Acetonitril vorgelegt wurde, angesetzt. Die Funktion des Acetonitrils besteht darin, die Adsorption der Analyte an der Glasoberfläche zu unterbinden. Durch das

Hinzupipettieren von Wasser und Dotierlösung gemäß Pipettierschema (Tabelle 4) entstehen Kalibrierlösungen mit Analytkonzentrationen von 0,1 bis 10,0 µg/l (bezogen auf den Wasseranteil). Die Kalibrierstandards werden analog zu den Urinproben gemäß Abschnitt 5.2 aufgearbeitet, beginnend mit der Zugabe des ISTD.

Tab. 4 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Urin

Kalibrierstandard	Acetonitril [µl]	Wasser [µl]	Dotierlösung I [µl]	Dotierlösung II [µl]	Wasseranteil [µl]	Konzentration im Wasseranteil [µg/l]
0	1000	50	–	–	50	0,0
1	1000	49	–	1	50	0,1
2	1000	48	–	2	50	0,2
3	1000	45	–	5	50	0,5
4	1000	40	–	10	50	1,0
5	1000	32,5	–	17,5	50	1,75
6	1000	25	–	25	50	2,5
7	1000	12,5	–	37,5	50	3,75
8	1000	–	–	50	50	5,0
9	1000	40	10	–	50	10,0

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Der Urin wird in verschließbaren Urinbechern gesammelt und gegebenenfalls auf Urinmonovetten[®] gezogen. Bei Lagerung bei –18 °C sind die Urinproben mindestens ein Jahr haltbar.

5.2 Probenaufbereitung

Die Urinproben werden aufgetaut und intensiv geschüttelt. Ein Aliquot von 50 µl wird entnommen und in ein 10-ml-Schraubgläschen überführt, in dem 1 ml Acetonitril vorgelegt wurde. Nach der Zugabe von 25 µl der ISTD-Dotierlösung und kurzem Homogenisieren wird die Lösung in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt. Zu dem meist öligen Rückstand werden nacheinander 0,5 ml TFE und 1 ml eiskaltes (–18 °C) TFAA gegeben, dann wird kurz auf dem Vortex-Mischer gemischt. Abhängig von der Restwassermenge kann es gegebenenfalls zu einer starken Wärmeentwicklung kommen. Für die Derivatisierung wird das festverschlossene Gläschen im Heizblock für eine Stunde auf 80–85 °C erhitzt. Anschließend wird die Lösung bei geöffnetem Gläschen bei 80–85 °C ohne Stickstoffzufuhr auf 50–100 µl eingengt. An dieser Stelle darf nicht bis zur Trockene eingedampft werden, da dies zu Verlusten an AMPA führt. Der abgekühlte Rückstand wird in 50 µl Methanol aufgenommen und in ein Autosampler-Vial mit Mikro-Einsatz überführt.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einem Gaschromatographen mit Tandem-Massenspektrometer.

Gaschromatographie

Kapillarsäule:	stationäre Phase:	Polyethylenglykol
	Länge:	30 m
	Innendurchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 µm
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 75 °C, 0,5 min isotherm, dann Anstieg mit 20 °C/min auf 170 °C, 5 min isotherm, dann Anstieg mit 40 °C/min auf 265 °C, 3,5 min bei Endtemperatur
	Injektor:	255 °C
	Transfer-Line:	280 °C
Trägergas:	Helium 4.6	Flussrate: 1,2 ml/min, ab 10 min 2,0 ml/min
Injektion:	Injektionsvolumen:	1 µl (pulsed splitless, 120 kPa für 30 s), Split on nach 0,5 min
Liner:		4 mm Innendurchmesser mit Quarzwolle

Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung:	Negative chemische Ionisation (NCI)
CI-Gas:	Methan 4.5
Ionisierungsenergie:	240 eV
Quellentemperatur:	150 °C
Quadrupoltemperatur:	150 °C
Kollisionsgas:	Argon 5.0
Kollisionsenergie:	siehe Tabelle 5
Elektronenmultiplier:	1700 V

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

7 Analytische Bestimmung

Zur analytischen Bestimmung werden 1 µl der nach [Abschnitt 5.2](#) aufgearbeiteten Proben in den Gaschromatographen injiziert. Bei jeder Analysenserie werden mindestens eine Qualitätskontrollprobe (siehe [Abschnitt 10](#)) und ein Reagenzienleerwert mitanalysiert. Für letzteren wird anstelle von Urin hochreines Wasser wie beschrieben aufgearbeitet.

Die Ionisation und Fragmentierung der Analyten in der Ionenquelle des Massenspektrometers erfolgt durch negative chemische Ionisation mit Methan als Reaktandgas. Unter Verwendung von Argon als Kollisionsgas kommt es durch stoßinduzierten Zerfall ausgewählter Vorläufer-Ionen zur Bildung spezifischer Produkt-Ionen, welche detektiert werden. Die zeitlichen Verläufe der in [Tabelle 5](#) aufgeführten Ionenübergänge wurden im MRM (*Multiple Reaction Monitoring*)-Modus des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers aufgezeichnet.

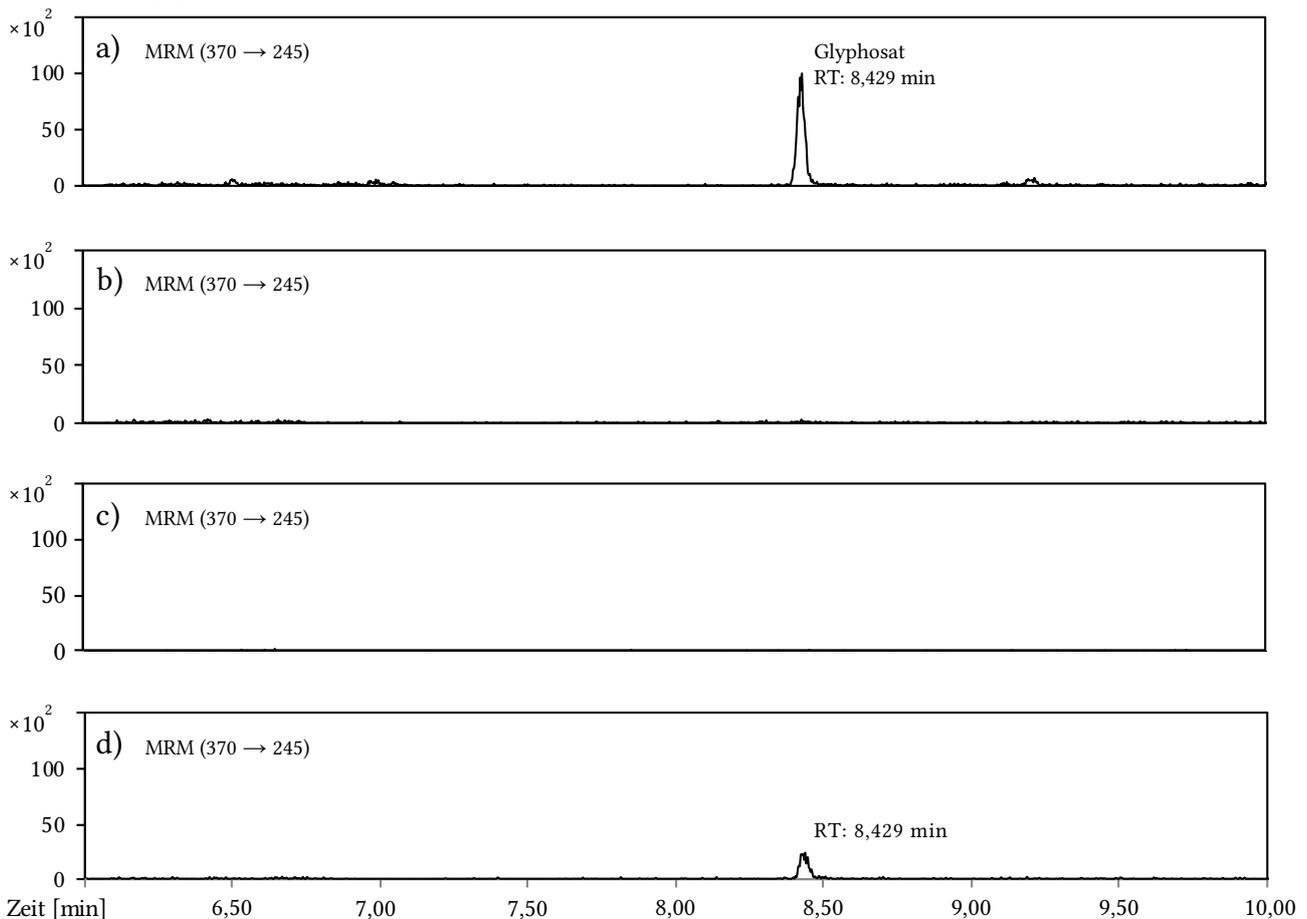
Tab. 5 Retentionszeiten, registrierte Ionenübergänge und verwendete Kollisionsenergien für die Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Urin

Parameter	Retentionszeit [min]	Vorläufer-Ion [m/z]	Produkt-Ion [m/z]	Kollisionsenergie [eV]	Detektiertes Fragment
Glyphosat ^{a)} , 1. Übergang	8,4	370	245	10	(CF ₃ CH ₂ -O) ₂ -P=O] ⁻
Glyphosat, 2. Übergang	–	351	268	5	351 – CF ₃ CH ₂] ⁻
Glyphosat-d ₂	8,4	372	245	10	(CF ₃ CH ₂ -O) ₂ -P=O] ⁻
AMPA ^{a)} , 1. Übergang	10,4	351	268	5	351 – CF ₃ CH ₂] ⁻
AMPA, 2. Übergang	–	271	188	5	271 – CF ₃ CH ₂] ⁻
¹³ C, ¹⁵ N-AMPA	10,4	353	270	5	353 – CF ₃ CH ₂] ⁻

^{a)} zur quantitativen Auswertung herangezogener Übergang

Die in [Tabelle 5](#) angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Kapillarsäule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen. Die MRM-Parameter sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender angepasst werden. [Abbildungen 2](#) und [3](#) zeigen exemplarische Chromatogramme auf den Q₂-Massenspuren von Glyphosat und AMPA. Die gezeigten Chromatogramme sind nicht geglättet.

Abundanz [cps]


Abb. 2 Beispielchromatogramme aufgearbeiteter Proben auf der Q₂-Massenspur von Glyphosat (MRM 370 → 245): a) belastete Urinprobe (0,53 µg/l), b) unbelastete Urinprobe, c) Reagenzienleerwert, d) Kalibrierstandard (0,1 µg/l; BG)

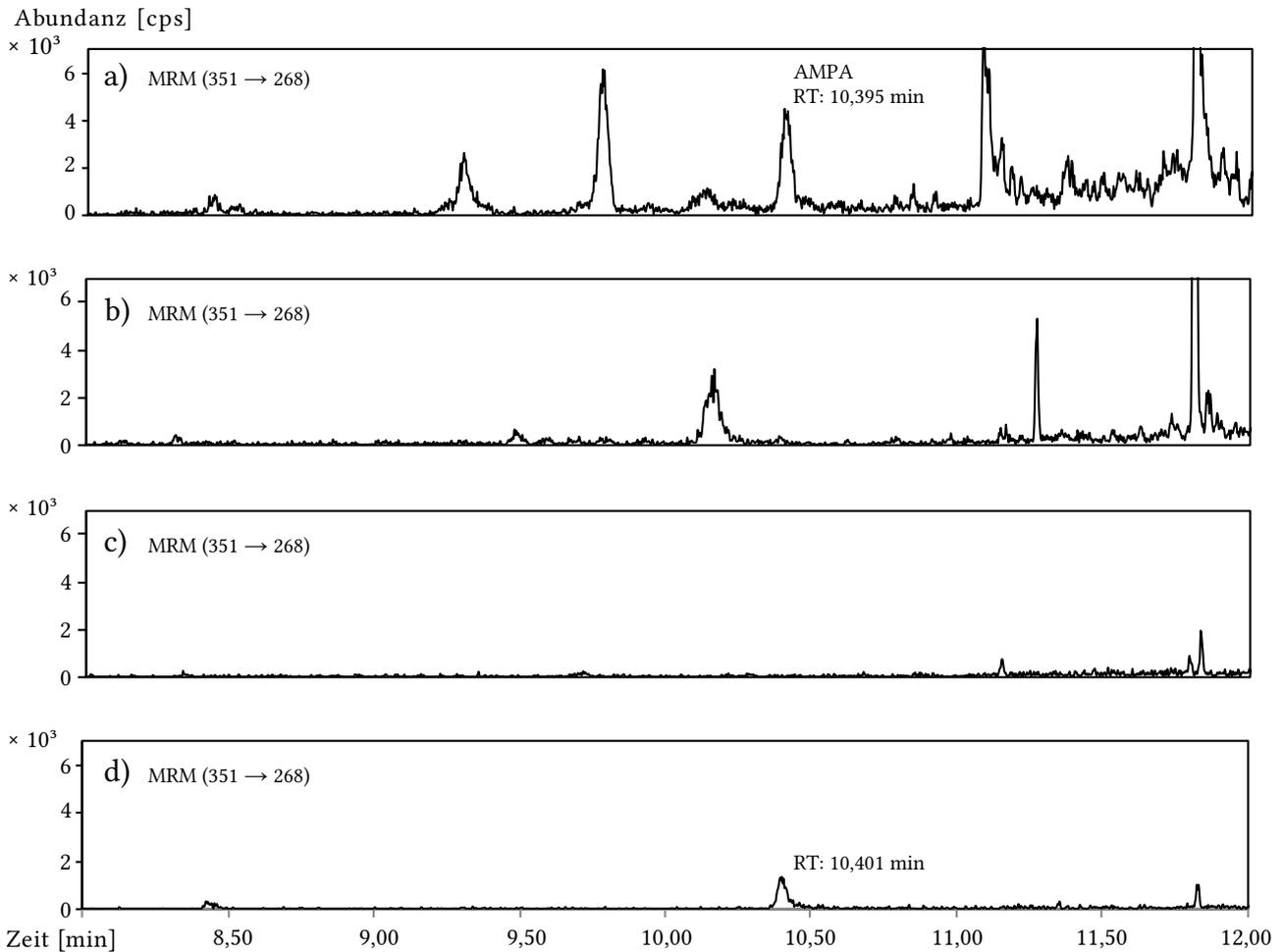


Abb. 3 Beispielchromatogramme aufgearbeiteter Proben auf der Q_2 -Massenspur von AMPA (MRM 351 \rightarrow 268): a) belastete Urinprobe (0,16 $\mu\text{g/l}$), b) unbelastete Urinprobe, c) Reagenzienleerwert, d) Kalibrierstandard (0,1 $\mu\text{g/l}$; BG)

8 Kalibrierung

In jeder Analysenserie wird eine Kalibrierreihe mitgeführt und die Kalibriergeraden werden neu erstellt.

Zur Erstellung der Kalibriergeraden werden die gemäß [Abschnitt 4.4](#) angesetzten Kalibrierstandards aufgearbeitet und mittels GC-MS/MS analysiert. Die Kalibriergeraden werden erstellt, indem die Peakflächenverhältnisse der Analyten und ISTDs gegen die jeweiligen Analytkonzentrationen aufgetragen werden. Die Steigung und der Achsenabschnitt der Kalibriergeraden werden mittels linearer Regression berechnet.

Die Kalibriergeraden verlaufen zwischen der Bestimmungsgrenze (0,1 $\mu\text{g/l}$) und 10 $\mu\text{g/l}$ linear. [Abbildung 4](#) zeigt exemplarische Kalibriergeraden für Glyphosat und AMPA, die in Wasser und in Poolurin angesetzt wurden. Die Kalibriergeraden in beiden Matrices verlaufen nahezu parallel. Unter Routinebedingungen wird bevorzugt auf Basis von Wasser kalibriert, da Poolurin Hintergrundgehalte an Glyphosat und AMPA aufweisen kann.

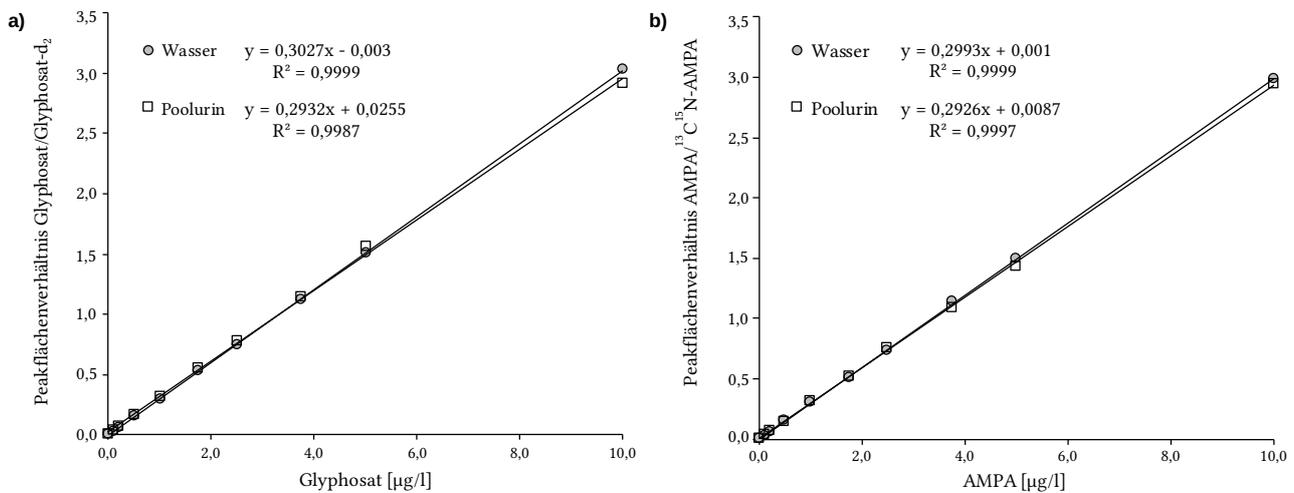


Abb. 4 In Wasser und in Poolurin angesetzte Kalibriergeraden für a) Glyphosat und b) AMPA

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Die Berechnung der Glyphosat- und AMPA-Konzentrationen in den Analysenproben erfolgt mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion (Abschnitt 8). Die in den Proben ermittelten Peakflächenverhältnisse der jeweiligen Analyten und ISTDs werden von der Auswertesoftware des GC-MS/MS-Systems in die Kalibrierfunktionen eingesetzt und die Analytgehalte in $\mu\text{g/l}$ errechnet. Bei beiden Analyten ist kein oder nur ein geringer Leerwert ($< 0,03 \mu\text{g/l}$) zu erwarten.

Liegt der Messwert außerhalb des Kalibrierbereichs ($> 10 \mu\text{g/l}$), wird die Urinprobe mit hochreinem Wasser entsprechend verdünnt, erneut aufgearbeitet und vermessen.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014).

Zur Präzisionskontrolle wird in jeder Analysenserie mindestens eine Qualitätskontrollprobe mituntersucht, die eine konstante Konzentration an Glyphosat und AMPA aufweist. Da käufliches Material derzeit nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Dazu werden individuelle Urinproben zu einem Poolurin in der Weise zusammengestellt, dass sich Konzentrationen in dem bei den Analysen zu erwartenden Konzentrationsbereich ergeben. Im Bedarfsfall wird der Poolurin mit entsprechenden Mengen an Analyten aufdotiert. Von diesem Kontrollmaterial wird ein Jahresbedarf hergestellt, in 2-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren aufbewahrt. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode (einfache Analyse des Kontrollmaterials an 20 Tagen) ermittelt.

11 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Prüfung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor und durch die erfolgreiche Teilnahme am *German External Quality Assessment Scheme* (G-EQUAS; <https://app.g-equas.de/web/>) bestätigt.

11.1 Präzision

Präzision in der Serie

Für die Bestimmung der Präzision in der Serie wurden Urinproben von beruflich nicht gegen Glyphosat exponierten Personen gepoolt und mit Glyphosat und AMPA in den Konzentrationen von jeweils 0,1 µg/l, 0,5 µg/l, 1,0 µg/l und 5,0 µg/l dotiert. Jeweils zehn dieser Proben wurden an einem Tag aufgearbeitet und analysiert. Die so ermittelten Präzisionen sind [Tabelle 6](#) zu entnehmen. Hintergrundgehalte an Glyphosat und AMPA waren in dem verwendeten Poolurin nicht nachweisbar (<0,03 µg/l).

Tab. 6 Präzision in der Serie für die Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Urin (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Glyphosat	0,1	9,13	20,7
	0,5	2,68	6,06
	1,0	2,70	6,11
	5,0	4,74	10,7
AMPA	0,1	8,91	20,2
	0,5	4,37	9,88
	1,0	2,70	6,11
	5,0	2,41	5,45

Präzision von Tag zu Tag

Darüber hinaus wurde die Präzision von Tag zu Tag bestimmt. Mit 0,5 µg/l und 2,5 µg/l dotierte Poolurine wurden an 15 verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die so ermittelten Präzisionen sind [Tabelle 7](#) zu entnehmen. Hintergrundgehalte an Glyphosat und AMPA waren in den verwendeten Poolurinen nicht nachweisbar (<0,03 µg/l).

Tab. 7 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Urin (n = 15)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Glyphosat	0,5	5,15	11,1
	2,5	3,35	7,19
AMPA	0,5	4,32	9,27
	2,5	3,03	6,50

11.2 Richtigkeit

Wiederfindung

Zur Prüfung der Richtigkeit des Verfahrens wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Hierzu wurden Urinproben von unbelasteten Personen gepoolt, mit Glyphosat und AMPA in den Konzentrationen von jeweils 0,1 µg/l, 0,5 µg/l, 1,0 µg/l und 5,0 µg/l dotiert, zehnfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die mittlere relative Wiederfindung ist in [Tabelle 8](#) zusammengestellt.

Tab. 8 Mittlere relative Wiederfindung für die Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Urin (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Rel. Wiederfindung r [%]	
		Mittelwert	Bereich
Glyphosat	0,1	98,1	85,5–115
	0,5	110	104–116
	1,0	86,6	79,5–102
	5,0	102	98,6–106
AMPA	0,1	100	89,2–116
	0,5	111	102–121
	1,0	99,4	94,4–106
	5,0	99,0	95,2–105

Zusätzlich wurde die Wiederfindung unter Verwendung dotierter Individualurine geprüft. Die Ergebnisse sind in [Abschnitt 11.3](#) dargestellt.

Inter-Labor-Methodenvergleich

Mit der vorliegenden GC-MS/MS-Methode (MVZ Medizinisches Labor Bremen GmbH) und einer LC-MS/MS-Methode (Health and Safety Executive, Harpur Hill, Buxton, UK) wurden 33 native Urinproben im Rahmen eines Inter-Labor-Methodenvergleichs analysiert. Bei 20 Proben lagen die Glyphosatkonzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenzen beider Methoden. Die Messergebnisse dieser Proben wiesen eine starke Korrelation auf ($R^2 = 0,9891$, siehe [Abbildung 5](#)). AMPA wurde in den Inter-Labor-Methodenvergleich nicht einbezogen, da dieser Parameter nicht mittels LC-MS/MS bestimmt wurde.

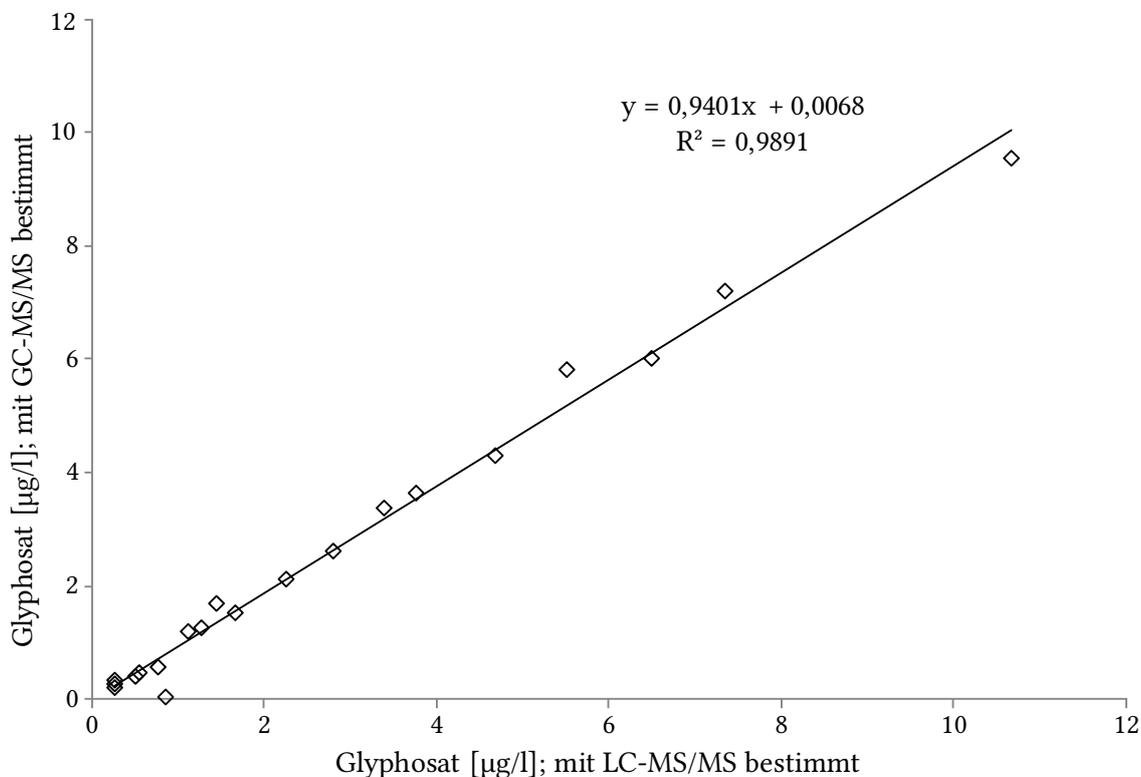


Abb. 5 Ergebnisse des Inter-Labor-Methodenvergleichs unter Verwendung von GC-MS/MS (MVZ Bremen, DE) bzw. LC-MS/MS (HSE, Buxton, UK) für die Glyphosatbestimmung

G-EQUAS Ringversuche

Der Methodenentwickler nahm mit dem hier beschriebenen Verfahren durchgehend erfolgreich an den G-EQUAS-Ringversuchen (RV) Nr. 64 bis 70 teil (Hoppe 2021 a), wobei die Kontrollmaterialien nur Glyphosat aber kein AMPA enthielten. In [Tabelle 9](#) werden die Ergebnisse von RV 64 bis RV 67 detailliert aufgeführt. Die Kontrollmaterialien (Urine) wurden mit dem aktuellen ISTD Glyphosat-d₂ und dem Vorgänger-ISTD 1,2-¹³C₂,¹⁵N-Glyphosat parallel gemessen. Die Abweichungen von den Sollwerten sind gering und belegen die Richtigkeit der Methode sowie die Gleichwertigkeit beider ISTDs.

Tab. 9 G-EQUAS Ringversuchsergebnisse für die Bestimmung von Glyphosat in Urin

Probe	Sollwert [µg/l]	Toleranzbereich [µg/l]	Glyphosat-d ₂ als ISTD		1,2- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Glyphosat als ISTD	
			Ergebnis [µg/l]	Abweichung [%]	Ergebnis [µg/l]	Abweichung [%]
64 A	0,88	0,52–1,24	0,87	-1,1	0,86	-2,3
64 B	3,73	2,47–4,99	3,73	0,0	3,74	0,3
65 A	0,42	0,27–0,57	0,45	7,1	0,45	7,1
65 B	1,78	1,33–2,23	1,88	5,6	1,81	1,7
66 A	0,64	0,49–0,79	0,67	4,7	0,62	-3,1
66 B	1,20	0,93–1,47	1,25	4,2	1,17	-2,5
67 A	0,30	0,21–0,39	0,27	-9,3	0,28	-6,7
67 B	2,39	1,85–2,93	2,39	0,0	2,49	4,2

11.3 Matrixeffekte

Zur Überprüfung von Matrixeffekten wurden Kalibrierstandards für Glyphosat und AMPA im Konzentrationsbereich 0,1–10 µg/l sowohl in gepooltem Urin als auch in hochreinem Wasser angesetzt (siehe [Abschnitt 4.4](#)), aufgearbeitet und analysiert. In [Abbildung 4](#) (siehe [Abschnitt 8](#)) ist zu erkennen, dass die Kalibriergeraden in beiden Matrices nahezu parallel verlaufen, mögliche Matrixeffekte also durch die isotopenmarkierten ISTDs gut kompensiert werden. Unter Routinebedingungen kann daher statt in Urin in hochreinem Wasser kalibriert werden.

Zur weiteren Überprüfung von Matrixeffekten wurden zehn Individualurine sowohl undotiert als auch nach Dotierung mit je 0,5 µg, 2,5 µg bzw. 5,0 µg Glyphosat und AMPA pro Liter aufgearbeitet und analysiert. Die Glyphosat- und AMPA-Konzentrationen der undotierten Proben lagen im Bereich <NWG–0,08 µg/l bzw. <NWG–0,09 µg/l. Die mittleren relativen Wiederfindungen sind in [Tabelle 10](#) dargestellt und lassen erkennen, dass kein relevanter Matrixeffekt vorliegt.

Tab. 10 Mittlere relative Wiederfindung für die Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Individualurinen (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg/l]	Rel. Wiederfindung r [%]	
		Mittelwert	Bereich
Glyphosat	0,5	95,0	86,9–105
	2,5	96,9	92,7–105
	5,0	101	95,9–109
AMPA	0,5	95,0	89,2–103
	2,5	98,3	93,1–101
	5,0	106	99,5–110

11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Unter den angegebenen Arbeitsbedingungen und basierend auf einem Signal/Rausch-Verhältnis von 10 zu 1 betragen die Bestimmungsgrenzen für Glyphosat und AMPA jeweils 0,1 µg/l (Tabelle 11). Der Variationskoeffizient (die Präzision) an der Bestimmungsgrenze beträgt 9% und die Wiederfindung 85–116% für beide Analyten. Die Nachweisgrenzen liegen jeweils bei 0,03 µg/l (Signal/Rausch-Verhältnis von 3 zu 1). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden mit der Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 (DIN 2008) bestätigt.

Tab. 11 Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
Glyphosat	0,03	0,1
AMPA	0,03	0,1

11.5 Störeinflüsse

Die Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Humanurin ist anspruchsvoll. Folgende Punkte der beschriebenen Methode sollten besonders beachtet werden:

Um in den Proben und Kalibrierstandards die Adsorption der underivatisierten Analyten an der Glasoberfläche zu vermeiden, sollten die Urinproben und die Standardlösungen stets auf vorgelegtes Acetonitril pipettiert werden. Das Einengen der Probenlösungen ist unkritisch, da die sehr polaren Analyten nicht flüchtig sind. Nach der Derivatisierung darf allerdings nicht bis zur Trockene eingengt werden, um Verluste an AMPA zu vermeiden. Das derivatisierte Glyphosat verhält sich dagegen unkritisch. Nach dem Einengungsschritt wird dem Rückstand Methanol zugesetzt, um überschüssiges TFAA durch Umsetzung zum Trifluoressigsäuremethylester zu eliminieren.

Auch an das Messsystem werden hohe Anforderungen gestellt. An Borosilikat-Verdampferrohren (*Linern*) können bereits nach wenigen Injektionen der matrixhaltigen Messlösungen starke Adsorptionseffekte auftreten. Die resultierende Peakverbreiterung und das Tailing führen dann zu einer Beeinträchtigung von Nachweisgrenze und Wiederfindung. Zudem reagiert AMPA besonders empfindlich auf Verschmutzungen am Säulenkopf und im Injektionssystem. Diese Problematik kann zuverlässig umgangen werden, indem hochgradig deaktivierte Liner (z. B. Topaz-Liner von Restek GmbH, Bad Homburg vor der Höhe) benutzt werden, die etwas Quarzwolle zur Unterstützung der Verdampfung enthalten.

Auch die Wahl der Trennsäule ist entscheidend. Unter Routinebedingungen hat sich die polare HP INNOWax (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn) durch hohe Trennleistung und lange Standzeiten (ca. 600–800 Proben) bewährt, soweit der Säulenkopf regelmäßig gekürzt wird. Die unpolare Zebtron™ ZB-5-Säule (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg) weist anfangs ebenfalls eine hohe Trennleistung auf, aufgrund der hohen Matrixlast der Messlösungen ist sie aber nur kurzzeitstabil und erwies sich als nicht routinetauglich.

12 Diskussion der Methode

Bedingt durch die gute Wasserlöslichkeit, die Polarität und die geringe Molekülmasse der Analyten sind Methoden zur Quantifizierung von Glyphosat und AMPA in humanbiologischem Material relativ anspruchsvoll. Die Mehrzahl der publizierten, älteren HPLC-Methoden basiert auf Fluoreszenzdetektion nach Proteinfällung und anschließender Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) oder Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) (Acquavella et al. 2004; Hori und Fujisawa 2005). Anreicherung und Matrixabtrennung erfolgen meist durch Festphasenextraktion an Kationenaustauschern oder einem Chelex-Harz (Freuze et al. 2007). Die Nachweisgrenze für die Bestimmung von Glyphosat in Urin und Serum wird bei diesen Verfahren meist mit 1 µg/l angegeben. Erst die modernen, nachweisstarken LC-MS/MS-Methoden ermöglichen eine direkte Chromatographie ohne Derivatisierung. Eine Retention der

beiden Analyten gelingt auf Anionenaustausch-Säulen, auf HILIC-Säulen oder mittels Ionenpaar-Chromatographie unter Verwendung von Urin (Jensen et al. 2016), Serum (Wang et al. 2008) oder Muttermilch (Jensen et al. 2016; Steinborn et al. 2016). Die Probenvorbereitungsschritte umfassen Proteinfällung, Ultrafiltration oder Festphasenextraktion (Wang et al. 2008). Die Bestimmungsgrenzen werden mit 0,1 bis 10 µg/l angegeben.

Die bisher publizierten GC-MS-Methoden stammen aus dem Bereich der klinischen Chemie und verwenden Serum als Untersuchungsmaterial. Da Glyphosat und AMPA zu polar für die Gaschromatographie sind, müssen beide Analyten derivatisiert werden. Nach Proteinfällung und Festphasenextraktion auf Styrol-Divinylbenzol- (Motojyuku et al. 2008) oder Anionenaustausch-Kartuschen (Hori et al. 2003) werden die Analyten silyliert und auf unpolaren GC-Trennsäulen (Typ DB5) chromatographiert. Die Nachweisgrenzen der GC-MS-Methoden sind relativ hoch und liegen bei 100 µg/l (Hori und Fujisawa 2005).

Die vorliegende GC-MS/MS-Methode beruht auf dem Ansatz von Alferness und Iwata (1994) zur direkten Bestimmung von Glyphosat und AMPA in wässrigen Proben. Ursprünglich für die Lebensmittelanalytik entwickelt (Alferness und Wiebe 2001; Kittlaus et al. 2009), kann das Verfahren auch für die sehr empfindliche Bestimmung von Glyphosat und AMPA in Humanurin (Hoppe 2013; Krüger et al. 2014) und Muttermilch (Steinborn et al. 2016) genutzt werden. Aufwendige Extraktions- und Aufreinigungsschritte entfallen dabei. Um die Flüchtigkeit der polaren Analyten zu erhöhen, werden die funktionellen Gruppen (Phosphonsäure-, Amino- und Carboxylgruppe) mit TFE/TFAA direkt in der aufkonzentrierten Urinprobe derivatisiert. Die Reagenzien werden in hohem Überschuss zugesetzt, um Wasserreste zu binden. Auf einer polaren Kapillarsäule (z. B. HP INNOWax, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn) ergeben derivatisiertes Glyphosat und AMPA schmale, symmetrische Peaks.

Die eingeführten Trifluoralkylgruppen ermöglichen zudem die hohe Empfindlichkeit und Selektivität der vorliegenden GC-MS/MS-Methode im NCI-Modus. **Abbildung 6** zeigt die Strukturen der derivatisierten Analyten und ihrer isopenmarkierten ISTDs.

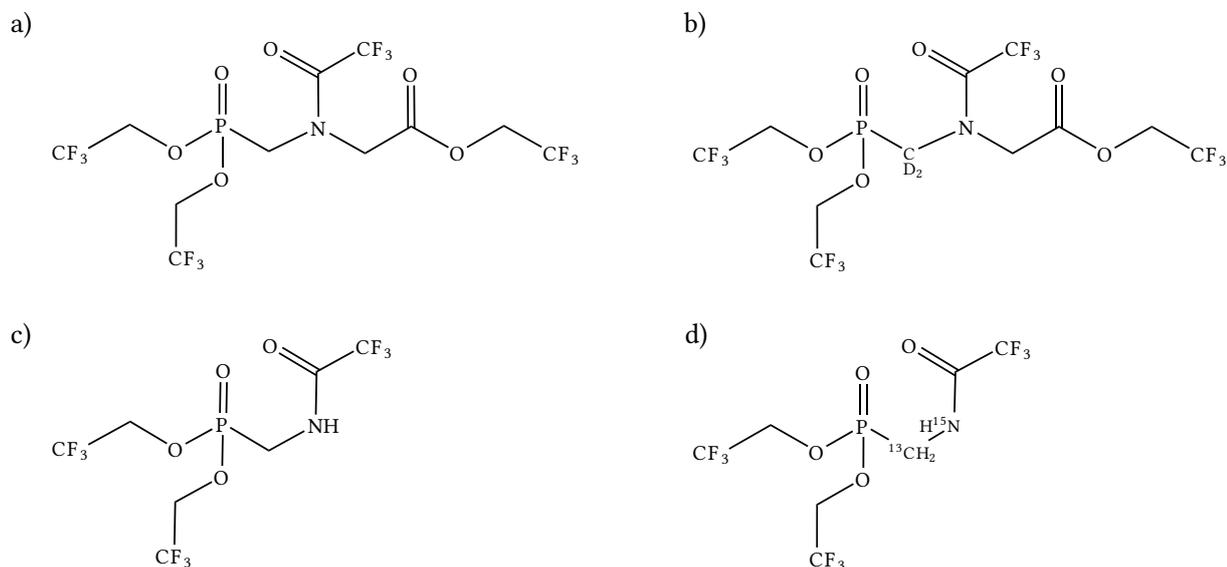


Abb. 6 Strukturen von jeweils mit TFE/TFAA derivatisiertem a) Glyphosat (511 g/mol), b) Glyphosat-d₂ (513 g/mol), c) AMPA (317 g/mol) und d) ¹³C,¹⁵N-AMPA (373 g/mol)

Unter NCI-Bedingungen unterliegen derivatisiertes Glyphosat und AMPA nur einer sehr geringen Fragmentierung und bilden intensive Vorläufer-Ionen bei *m/z* 370 bzw. *m/z* 351. Die aus dem natürlichen ¹³C-Anteil resultierenden *M* + 1-Satellitenpeaks bei *m/z* 371 bzw. *m/z* 352 sind von den Vorläufer-Ionen der isopenmarkierten Standards Glyphosat-d₂ und ¹³C,¹⁵N-AMPA bei *m/z* 372 bzw. *m/z* 353 abgetrennt. Die Massenspektren der Vorläufer-Ionen von

Glyphosat und Glyphosat-d₂ sind in [Abbildung 7](#) dargestellt, die entsprechenden Spektren von AMPA und ¹³C,¹⁵N-AMPA in [Abbildung 8](#) und die der jeweiligen Produkt-Ionen in [Abbildungen 9 und 10](#).

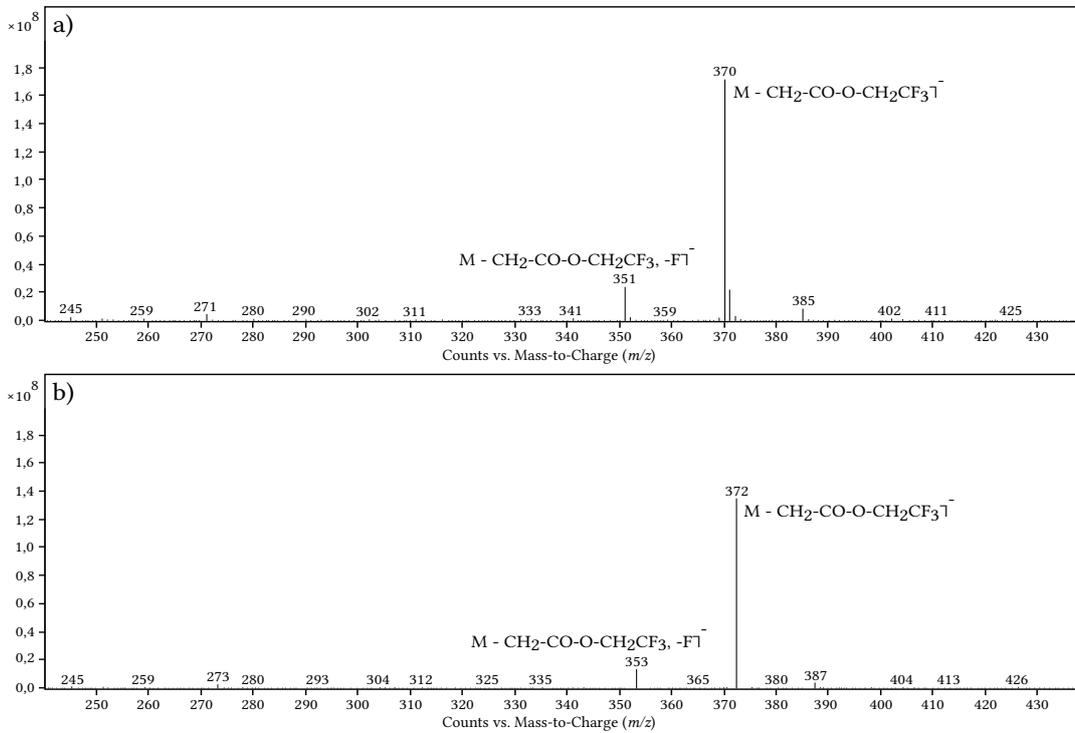


Abb. 7 Massenspektren der Vorläufer-Ionen (NCI-Modus) von derivatisiertem a) Glyphosat und b) Glyphosat-d₂

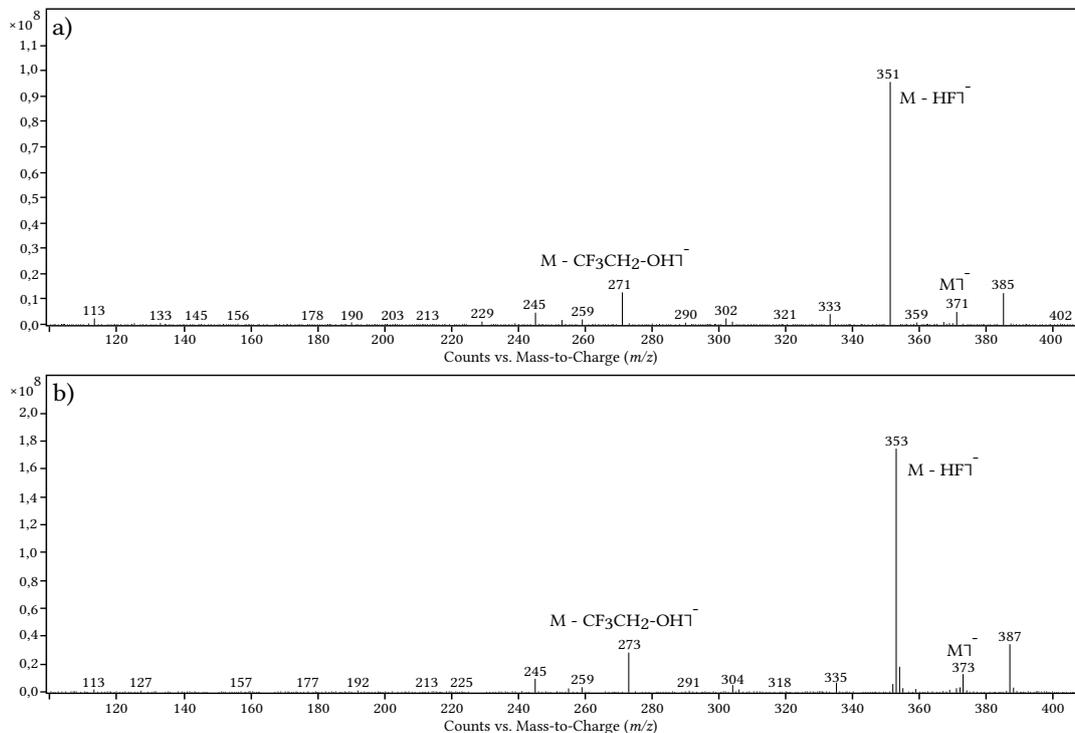


Abb. 8 Massenspektren der Vorläufer-Ionen (NCI-Modus) von derivatisiertem AMPA und ¹³C,¹⁵N-AMPA

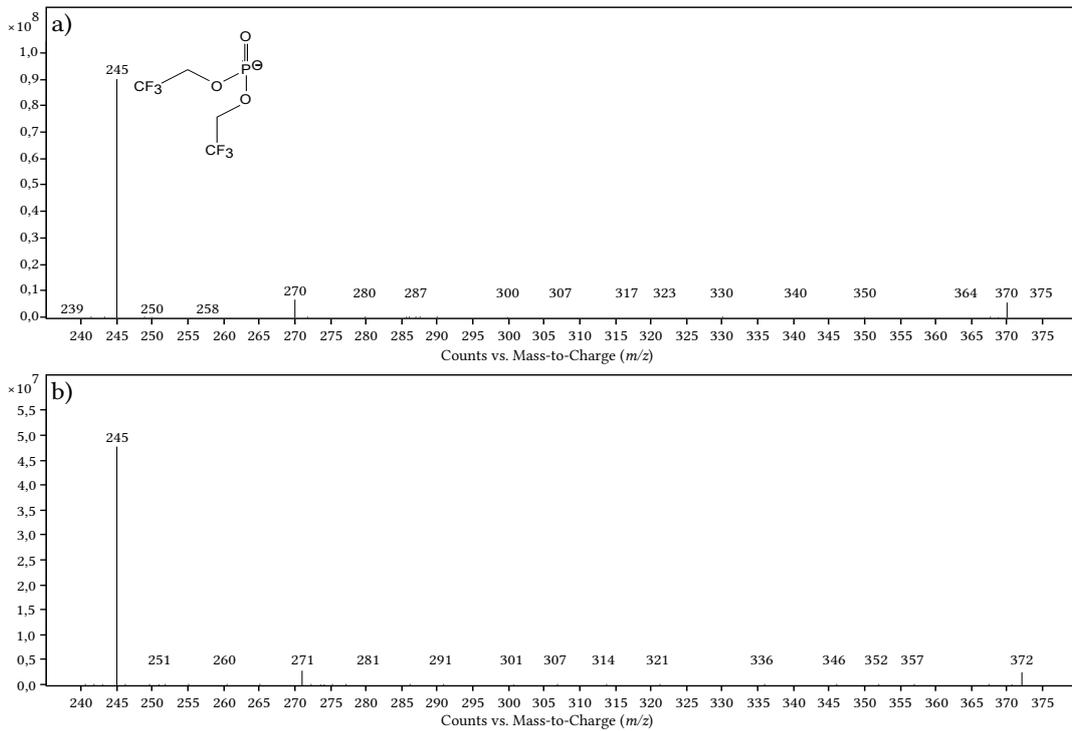


Abb. 9 Massenspektren der Produkt-Ionen von derivatisiertem a) Glyphosat und b) Glyphosat-d₂

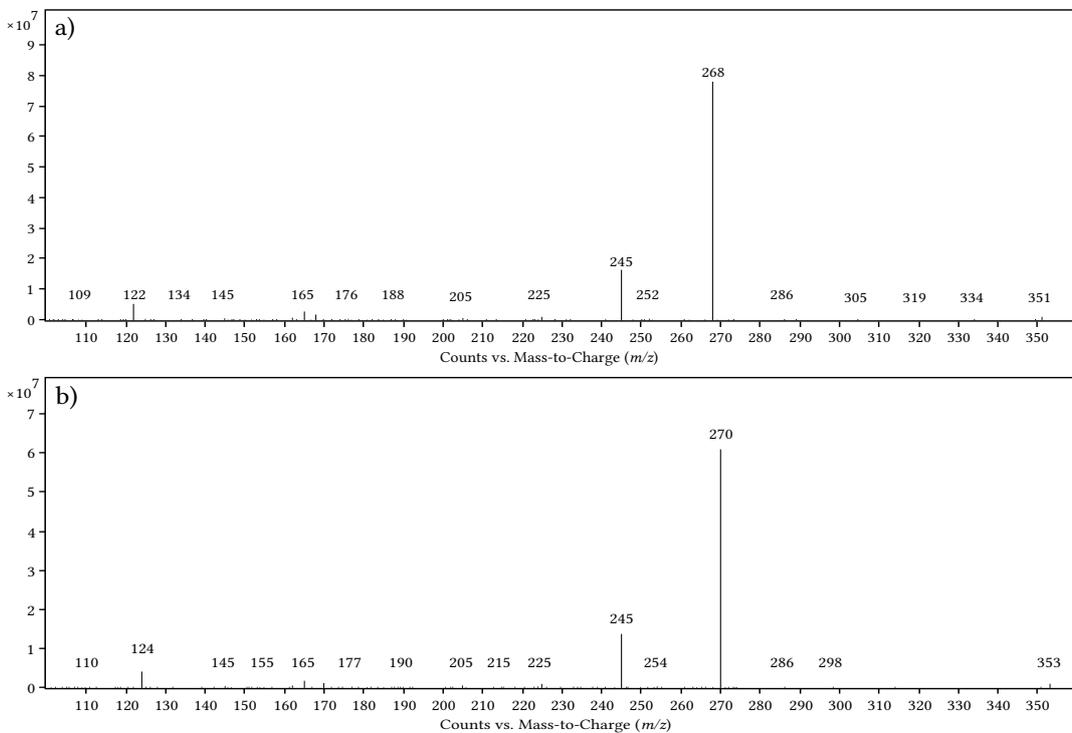


Abb. 10 Massenspektren der Produkt-Ionen von derivatisiertem a) AMPA und b) ¹³C,¹⁵N-AMPA

Der Basispeak m/z 370 im Massenspektrum von Glyphosat repräsentiert die Abspaltung eines $[\text{CH}_2\text{-CO-O-CH}_2\text{CF}_3]$ -Fragments vom nicht detektierbaren Molekül-Ion. Im Massenspektrum von AMPA ist das Molekül-Ion m/z 371 schwach sichtbar. Der Basispeak m/z 351 entsteht durch Abspaltung von HF, das intensitätsschwache Fragment m/z 271 durch Abspaltung von Trifluorethanol aus dem Molekül-Ion.

Die durch stoßinduzierte Fragmentierung entstehenden Produkt-Ionen sind in [Tabelle 5 \(Abschnitt 7\)](#) aufgelistet. Die Qualifierübergänge $351 \rightarrow 268$ und $271 \rightarrow 188$ erwiesen sich in der Praxis im angestrebten niedrigen Konzentrationsbereich als wenig nützlich, da sie erst bei sehr hohen Konzentrationen ($> 10 \mu\text{g/l}$) verlässliche Informationen lieferten. Aus diesem Grund wurden sie nicht in die Validierung miteinbezogen.

Im Zuge der Methodenoptimierung wurde der anfangs genutzte ISTD $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ -Glyphosat durch Glyphosat- d_2 ersetzt. $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ -Glyphosat fragmentiert unter Verlust von zwei Isotopenmarkierungen zum Vorläufer-Ion bei m/z 371, das mit dem Satellitenpeak gleicher Masse des nativen Glyphosats interferiert. Der Einfluss dieser spektralen Überlappung auf den ISTD auf der MRM-Spur m/z $371 \rightarrow 245$ wurde rechnerisch kompensiert. Parallelmessungen von G-EQUAS-Proben unter Verwendung beider ISTDs ergaben gleichermaßen geringe Abweichungen von den Sollwerten und belegen deren Gleichwertigkeit (siehe [Tabelle 9, Abschnitt 11.2](#)) sowie die Richtigkeit der GC-MS/MS-Methode. Der Vorteil von Glyphosat- d_2 besteht darin, dass die unerwünschte Interferenz mit dem nativen Glyphosat entfällt. Zudem ist aufgrund des größeren Abstandes der Precursor-Masse von Glyphosat (m/z 370) zu Glyphosat- d_2 (m/z 372) ein Reagenzienleerwert praktisch nicht mehr detektierbar.

Bekannt ist, dass Glyphosat und AMPA leicht an Glasoberflächen adsorbiert werden können (Alferness und Wiebe 2001). Die Probenaufarbeitung unserer Methode verwendet dennoch Glasröhrchen, da der Derivatisierungsschritt mit TFE/TFAA bei 80°C inerte Gefäße erfordert. Mögliche Adsorptionseffekte werden durch das vorgelegte Acetonitril unterbunden. Vorversuche mit drei handelsüblichen Polypropylen-Reaktionsgefäßen wiesen auf eine Reihe möglicher Probleme hin. In den Röhrchen von BRAND (Nr. BR780755, BRAND GMBH + CO KG, Wertheim) und Roche (Nr. 07857551001, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) wurden unter den Reaktionsbedingungen erhebliche Mengen an AMPA gebildet. In den von Connolly et al. (2020) verwendeten Reaktionsgefäßen von MACHEREY-NAGEL (Nr. 702500, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) kam es zu einer starken Abnahme der Peakflächen von Glyphosat und AMPA (ca. 63 % bzw. 32 %) im Vergleich zu Glasröhrchen. Sowohl die beobachtete Bildung von AMPA in den Leerröhrchen als auch die starke Abnahme der Signalintensitäten beider Analyten deuten auf Störungen durch Kunststoffadditive hin, die in das Reaktionsgemisch extrahiert werden.

Die Zuverlässigkeitskriterien der Methode sind für Glyphosat und AMPA als sehr gut zu bezeichnen. Die Richtigkeit wurde durch die hohe Wiederfindung in Poolurin und Individualurinen nach Dotierung belegt. Auch die Selektivität der GC-MS/MS-Methode ist sehr hoch. Signifikante Begleitpeaks wurden auf den Spuren der Massenübergänge beider Analyten nicht beobachtet. Für Glyphosat liegt zudem eine lückenlose Reihe bestandener Ringversuche (G-EQUAS, siehe [Tabelle 9, Abschnitt 11.2](#)) vor und in einem Laborvergleich wurde eine gute Korrelation zwischen den Analyseergebnissen für Glyphosat unter Verwendung der vorliegenden GC-MS/MS-Methode und einer unabhängigen LC-MS/MS-Methode ermittelt (siehe [Abbildung 5, Abschnitt 11.2](#)).

Zur Abschätzung einer Hintergrundbelastung mit Glyphosat und AMPA wurde im Jahr 2012 eine Studie an beruflich unbelasteten Mitarbeitern der MVZ Medizinisches Labor Bremen GmbH durchgeführt (Hoppe 2021 b). In [Tabelle 12](#) sind die in dieser Studie ermittelten 95. Perzentile aufgelistet, welche laborintern als orientierende Referenzwerte festgelegt wurden.

Tab. 12 Glyphosat- und AMPA-Konzentrationen in Urinproben einer laborinternen Studie

Kollektiv (Personenanzahl)	Analytische Methode	Analyt	BG [$\mu\text{g/l}$]	Konzentration [$\mu\text{g/l}$]		Nachweis­häufigkeit [%]
				95. Perzentil	Maximum	
Laborinterne Studie, Erwachsene (90)	GC-MS/MS	Glyphosat	0,15	0,8	1,0	66
		AMPA	0,15	0,5	2,8	22

In den Folgejahren wurden mit der hier vorgestellten GC-MS/MS-Methode bereits mehr als 2200 Urinproben überwiegend unspezifisch belasteter Personen gemessen (Conrad et al. 2017; Hoppe 2013; Lemke et al. 2021). Die Empfindlichkeit reicht aus, um höhere umweltbedingte Belastungen zu erkennen. Die 95. Perzentile liegen in der Regel zwischen 0,1 µg/l und 1 µg/l. Generell zeichnet sich die Methode durch einen geringen Probenbedarf von 50 µl und eine relativ einfache Probenvorbereitung aus, da eine Extraktion der Analyten entfällt. Pro Tag können ca. 40 Urinproben aufgearbeitet und gemessen werden.

Die instrumentellen Voraussetzungen sind deutlich geringer als die von vergleichbaren LC-MS/MS-Verfahren (Jensen et al. 2016). Der etwas höhere Zeitaufwand durch die Derivatisierung kommt erst bei entsprechend großer Probenanzahl zum Tragen.

Verwendete Messgeräte Gaschromatograph mit Split/Splitless-Aufgabesystem, tandem-massenspektrometrischem Detektor, Autosampler und Datensystem zur Auswertung (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn); Kapillargaschromatographische Säule (Länge: 30 m; Innendurchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 µm; stationäre Phase: Polyethylenglykol) (HP INNOWax, Nr. 19091N-133, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn), Liner (z. B. Topaz Liner von Restek GmbH, Bad Homburg vor der Höhe)

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (www.dfg.de/mak/interessenkonflikte) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

- Acquavella JF, Alexander BH, Mandel JS, Gustin C, Baker B, Chapman P, Bleeke M (2004) Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. *Environ Health Perspect* 112(3): 321–326. <https://doi.org/10.1289/ehp.6667>
- Alferness PL, Iwata Y (1994) Determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection. *J Agric Food Chem* 42(12): 2751–2759. <https://doi.org/10.1021/jf00048a020>
- Alferness PL, Wiebe LA (2001) Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in crops by capillary gas chromatography with mass-selective detection: collaborative study. *J AOAC Int* 84(3): 823–846. <https://doi.org/10.1093/jaoac/84.3.823>
- Antier C, Kudsk P, Reboud X, Ulber L, Baret PV, Messéan A (2020) Glyphosate use in the European agricultural sector and a framework for its further monitoring. *Sustainability* 12(14): 5682. <https://doi.org/10.3390/su12145682>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2020) Toxicological profile for glyphosate. Atlanta, GA: ATSDR. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp214.pdf>, abgerufen am 02 Mrz 2023
- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material*. 19. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Borggaard OK, Gimsing AL (2008) Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag Sci* 64(4): 441–456. <https://doi.org/10.1002/ps.1512>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 111(38): A1583–A1618
- Connolly A, Jones K, Galea KS, Basinas I, Kenny L, McGowan P, Coggins M (2017) Exposure assessment using human biomonitoring for glyphosate and fluroxypyr users in amenity horticulture. *Int J Hyg Environ Health* 220(6): 1064–1073. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.06.008>
- Connolly A, Basinas I, Jones K, Galea KS, Kenny L, McGowan P, Coggins MA (2018) Characterising glyphosate exposures among amenity horticulturists using multiple spot urine samples. *Int J Hyg Environ Health* 221(7): 1012–1022. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.06.007>

- Connolly A, Koslitz S, Bury D, Brüning T, Conrad A, Kolossa-Gehring M, Coggins MA, Koch HM (2020) Sensitive and selective quantification of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urine of the general population by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1158: 122348. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122348>
- Conrad A, Schröter-Kermani C, Hoppe H-W, Rütther M, Pieper S, Kolossa-Gehring M (2017) Glyphosate in German adults – time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int J Hyg Environ Health* 220(1): 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.016>
- Dill GM, Sammons RD, Feng PCC, Kohn F, Kretzmer K, Mehrsheikh A, Bleeke M, Honegger JL, Farmer D, Wright D, Hauptfear EA (2010) Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: Nandula VK, Hrsg. *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. S. 1–33. <https://doi.org/10.1002/9780470634394.ch1>
- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2008) DIN 32645:2008-11. *Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/1465413>
- Duke SO, Powles SB (2008) Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 64(4): 319–325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>
- ECHA (European Chemicals Agency) (2017) Glyphosate not classified as a carcinogen by ECHA. <https://echa.europa.eu/-/glyphosate-not-classified-as-a-carcinogen-by-echa>, abgerufen am 23 Feb 2023
- ECHA (European Chemicals Agency) (2022) Glyphosate: no change proposed to hazard classification. <https://echa.europa.eu/de/-/glyphosate-no-change-proposed-to-hazard-classification>, abgerufen am 03 Mai 2023
- EFSA (European Food Safety Authority) (2015 a) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J* 13(11): 4302. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2015 b) The 2013 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J* 13(3): 4038. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4038>
- Freuze I, Jadas-Hecart A, Royer A, Communal P-Y (2007) Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water. *J Chromatogr A* 1175(2): 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.092>
- Gillezeau C, van Gerwen M, Shaffer RM, Rana I, Zhang L, Sheppard L, Taioli E (2019) The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environ Health* 18: 2. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0435-5>
- Grandcoin A, Piel S, Baurès E (2017) AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: its sources, behavior and environmental fate. *Water Res* 117: 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055>
- Hoppe H-W (2013) Determination of glyphosate residues in human urine samples from 18 European countries. Report glyphosate MLHB-2013-06-06. Bremen: Medical Laboratory Bremen. https://www.foeeurope.org/sites/default/files/glyphosate_studyresults_june12.pdf, abgerufen am 23 Feb 2023
- Hoppe H-W (2021 a) Glyphosat-Ergebnisse aus G-EQUAS-Ringversuchen. E-Mail, 20 Aug 2021
- Hoppe H-W (2021 b) Hintergrundbelastung mit Glyphosat. E-Mail, 14 Jun 2021
- Hori Y, Fujisawa M (2005) Glufosinate and glyphosate. In: Suzuki O, Watanabe K, Hrsg. *Drugs and poisons in humans: a handbook of practical analysis*. Berlin: Springer-Verlag. S. 545–557. https://doi.org/10.1007/3-540-27579-7_61
- Hori Y, Fujisawa M, Shimada K, Hirose Y (2003) Determination of the herbicide glyphosate and its metabolite in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. A case of poisoning by Roundup® herbicide. *J Anal Toxicol* 27(3): 162–166. <https://doi.org/10.1093/jat/27.3.162>
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2017) Glyphosate. In: *Some organophosphate insecticides and herbicides*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Band 112. Lyon: IARC Press. S. 321–412. https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/6760/564e917d3cf4026bbc655ce69babf854f46e58d9.pdf, abgerufen am 23 Feb 2023
- Jaworski EG (1972) Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J Agric Food Chem* 20(6): 1195–1198. <https://doi.org/10.1021/jf60184a057>
- Jensen PK, Wujcik CE, McGuire MK, McGuire MA (2016) Validation of reliable and selective methods for direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in milk and urine using LC-MS/MS. *J Environ Sci Health B* 51(4): 254–259. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1120619>
- Kittlaus S, Lipinski J, Speer K (2009) New approaches for determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from different tea samples – prospects and limits of cleanup with molecularly imprinted polymer and titanium dioxide. *J AOAC Int* 92(3): 703–714. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.3.703>
- Krüger M, Schledorn P, Schrödl W, Hoppe H-W, Lutz W, Shehata AA (2014) Detection of glyphosate residues in animals and humans. *J Environ Anal Toxicol* 4(2): 210. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000210>
- LANUV (Landesamt für Natur Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) (2016) Bestimmung von Schadstoffen und Schadstoffmetaboliten im Urin von 2- bis 6-jährigen Kindern aus Nordrhein-Westfalen. Modul 2 Glyphosat. Düsseldorf: LANUV. https://www.lanuv.nrw.de/fileadmin/lanuv/gesundheit/pdf/2016/Projektbericht_KiTa-Studie_Modul-2_Endversion_17032016.pdf, abgerufen am 20 Sep 2021

- Lemke N, Murawski A, Schmied-Tobies MIH, Rucic E, Hoppe H-W, Conrad A, Kolossa-Gehring M (2021) Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urine of children and adolescents in Germany – human biomonitoring results of the German Environmental Survey 2014–2017 (GerES V). *Environ Int* 156: 106769. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106769>
- Motojyuku M, Saito T, Akieda K, Otsuka H, Yamamoto I, Inokuchi S (2008) Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 875(2): 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.003>
- Niemann L, Sieke C, Pfeil R, Solecki R (2015) A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. *J Verbrauch Lebensm* 10: 3–12. <https://doi.org/10.1007/s00003-014-0927-3>
- Rendon-von Osten J, Dzul-Caamal R (2017) Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: a survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int J Environ Res Public Health* 14(6): 595. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060595>
- Soukup ST, Merz B, Bub A, Hoffmann I, Watzl B, Steinberg P, Kulling SE (2020) Glyphosate and AMPA levels in human urine samples and their correlation with food consumption: results of the cross-sectional KarMeN study in Germany. *Arch Toxicol* 94: 1575–1584. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02704-7>
- Steinborn A, Alder L, Michalski B, Zomer P, Bendig P, Aleson Martinez S, Mol HGJ, Class TJ, Costa Pinheiro N (2016) Determination of glyphosate levels in breast milk samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 64: 1414–1421. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05852>
- Struger J, Van Stempvoort DR, Brown SJ (2015) Sources of aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urban and rural catchments in Ontario, Canada: glyphosate or phosphonates in wastewater? *Environ Pollut* 204: 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.038>
- Transparency Market Research (2014) Glyphosate market for genetically modified and conventional crops: global industry analysis, size, share, growth & forecast 2019. <https://www.prweb.com/releases/2014/08/prweb12107677.htm>, abgerufen am 23 Feb 2023
- US EPA (US Environmental Protection Agency) (2017) Revised glyphosate issue paper: evaluation of carcinogenic potential. TXR# 0057688. Washington, DC: US EPA. <https://downloads.regulations.gov/EPA-HQ-OPP-2009-0361-0073/content.pdf>, abgerufen am 23 Feb 2023
- Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, Morris JG Jr (2018) Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ* 616–617: 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Varona M, Henao GL, Díaz S, Lancheros A, Murcia Á, Rodríguez N, Álvarez VH (2009) Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos [Effects of aerial applications of the herbicide glyphosate and insecticides on human health]. *Biomedica* 29(3): 456–475. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v29i3.16>
- Wang K-C, Chen S-M, Hsu J-F, Cheng S-G, Lee C-K (2008) Simultaneous detection and quantitation of highly water-soluble herbicides in serum using ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 876(2): 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.042>
- Zhang F, Xu Y, Liu X, Pan L, Ding E, Dou J, Zhu B (2020) Concentration distribution and analysis of urinary glyphosate and its metabolites in occupationally exposed workers in Eastern China. *Int J Environ Res Public Health* 17(8): 2943. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082943>
- Zoller O, Rhyn P, Zarn JA, Dudler V (2020) Urine glyphosate level as a quantitative biomarker of oral exposure. *Int J Hyg Environ Health* 228: 113526. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113526>