

Evaluation of Fmoc-cl Efficiency in Glyphosate Derivatization and Its Analysis Using Hplc-pda

Diaa Ali* 
Dr. Tareq Arraj**
Dr. Hajer Nasser***

(Received 25 / 6 / 2025. Accepted 20 / 10 / 2025)

□ ABSTRACT □

Glyphosate, the active ingredient in the widely used herbicide Roundup, lacks chromophore and fluorophore groups, rendering direct analysis by spectroscopic and fluorometric methods challenging. To improve detectability, derivatization is commonly employed. This study evaluates the efficacy of 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) as a derivatization reagent in two solvent systems acetonitrile alone and an acetonitrile-water mixture followed by analysis using high-performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array (PDA) detection. Results demonstrate that FMOC-Cl remained stable in acetonitrile for up to 13 days, with its peak detected at 10.7 minutes. In contrast, stability in the acetonitrile-water mixture was significantly reduced to one day, as FMOC-Cl hydrolyzed completely into its byproduct, FMOC-OH, which exhibited a peak at 7.5 minutes. Successful derivatization of glyphosate was achieved when FMOC-Cl was dissolved solely in acetonitrile, as evidenced by the pesticide's peak at 3.9 minutes. No peak was observed when derivatization was performed in the acetonitrile-water system, highlighting the critical influence of solvent composition on derivatization efficiency.

Keywords: Glyphosate – Derivatization – FMOC-CL – HPLC.



Copyright :Latakia University Journal (Formerly Tishreen) -Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* Postgraduate Student (Ph.D.), Department of Environmental Chemistry, Higher Institute for Environmental Research, Latakia University (Formerly Tishreen) –Latakia- Syria. diaa.ali.dws@gmail.com.

**Assistant Professor, Environmental Chemistry –Higher Institute of Environment Researches – Latakia University (Formerly Tishreen) – Latakia –Syria.

*** Professor – Department of Analytical Chemistry – Faculty of Science - Latakia University (Formerly Tishreen), Latakia- Syria.

دراسة فعالية FMOC-CL في اشتقاق مبيد الأعشاب الغليفوزات والتحليل بواسطة تقانة HPLC/ PDA

ضياء علي*

د. طارق عراج**

د. هاجر ناصر***

(تاريخ الإيداع 25 / 6 / 2025. قبل للنشر في 20 / 10 / 2025)

□ ملخص □

يُعد الغليفوزات Glyphosate العنصر النشط لمبيد الأعشاب الأكثر استخداماً في العالم Round up. وبما أنه لا يحتوي في بنيته مجموعات chromophore أو fluorophore فإن تحليله المباشر باستخدام الطرائق الطيفية والفلورومتريّة يعدّ صعباً، لذلك غالباً ما تُجرى له عملية اشتقاق كيميائي للحصول على مشتقات أكثر قابلية للكشف. تم في هذه الدراسة تقييم فعالية كاشف الاشتقاق Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC-CL). أظهرت النتائج عند حلّه بالأسيتونتريل فقط وحلّه في مزيج من الأسيتونتريل والماء في اشتقاق الغليفوزات وبعد تحليله بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC المزود بكاشف PDA، أن الكاشف ثابت عند حلّه بالأسيتونتريل فقط لمدة تصل إلى 13 يوم، حيث ظهرت قمة FMOC-CL عند الدقيقة 10.7. أمّا عند حلّه بالأسيتونتريل والماء كان الكاشف مستقرّاً ليوم واحد فقط، إذ يتحوّل بالكامل إلى ناتج تحلله المائي FMOC-OH الذي ظهرت قمته عند الدقيقة 7.5. عند إجراء تفاعل الاشتقاق تبين قدرة الكاشف المحلول بالأسيتونتريل فقط على اشتقاق الغليفوزات حيث ظهرت قمة المبيد عند الدقيقة 3.9 ولم تظهر أي استجابة للكشف عنه عند إجراء تفاعل الاشتقاق بالكاشف المحلول بالأسيتونتريل والماء، مما يؤكد التأثير الحاسم لوسط الإذابة على كفاءة الاشتقاق الكيميائي.

الكلمات المفتاحية: الغليفوزات - الاشتقاق - FMOC-CL - HPLC.



حقوق النشر : مجلة جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً) - سوريا، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب

الترخيص 04 CC BY-NC-SA

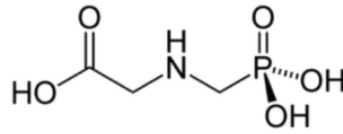
*طالب دكتوراه، قسم الكيمياء البيئية - المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً)، اللاذقية، سوريا، diaa.ali.dws@gmail.com.

**مدرس - قسم الكيمياء البيئية - المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً) - اللاذقية - سوريا.

***أستاذ - كلية العلوم - اختصاص كيمياء تحليلية - جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً) - اللاذقية - سوريا.

مقدمة:

يُعد الغليفوزات (Glyphosate) من مبيدات الأعشاب الجهازية واسعة الاستخدام، حيث يُستخدم لمكافحة الأعشاب الحولية والمعمرة، سواء الرفيعة أو العريضة الأوراق. يتم امتصاصه عبر المجموع الخضري للنبات، وينتقل إلى كلا المجموعين الجذري والخضري [1]. أُستخدِم لأول مرة من قبل شركة مونسانتو الأمريكية، ومنذ عام 2018 أصبحت تنتجها شركة باير الألمانية. ويتواجد الغليفوزات في أكثر من 750 مستحضراً تجارياً [2]. يتخذ الغليفوزات شكل مسحوق بلوري، عديم اللون والرائحة، غير متطاير، ذو انحلالية متوسطة في الماء (11.6 g/l)، في حين أن أملاحه قابلة للذوبان بسهولة في الماء. ويستخدم عادةً في شكل أملاح isopropylamine أو trimethylsulfonium، ويتم توزيعه على شكل مركبات SL ومساحيق SG قابلة للذوبان في الماء. ينتمي الغليفوزات إلى مجموعة المبيدات الفوسفورية العضوية، ويُعرف كيميائياً بالاسم [N-(phosphonomethyl) glycine]، وهو نظير أمينوفوسفوري للحمض الأميني الطبيعي glycine، وله الصيغة الجزيئية $C_3H_8NO_5P$. يتميز تركيبه الكيميائي بوجود ثلاث مجموعات وظيفية رئيسية هي: carboxymethyl, amine, phosphonomethyl، موضحة في الشكل رقم (1) [3].

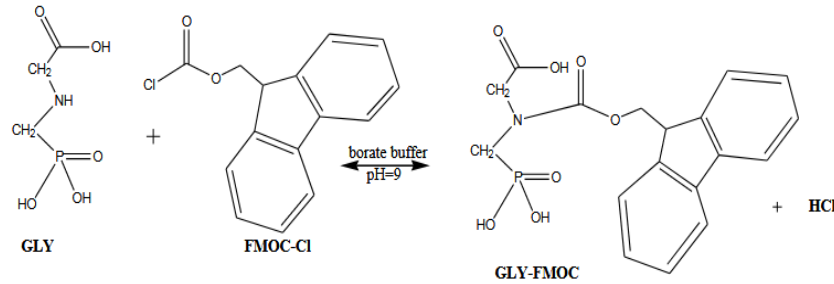
**Glyphosate****شكل (1): البنية الكيميائية للغليفوزات**

لا يحتوي الغليفوزات على مجموعة حاملة للون (Chromophore) أو مجموعة فلورية (Fluorophore) في بنيته، مما يصعب تحليله المباشر باستخدام كاشف الأشعة فوق البنفسجية (UV) أو كاشف المصفوفة الضوئية (PDA) أو كاشف الفلورة (FLD)، وهي الكواشف الشائعة في تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). لذلك، يُعد الاشتقاق الكيميائي Derivatization للغليفوزات خطوة ضرورية لتمكين الكشف الكيفي والكمي له [4]. يُستخدم تفاعل الاشتقاق على نطاق واسع في الكيمياء التحليلية، ويهدف إلى تحويل المركبات غير القابلة للكشف إلى مركبات مشتقة تمتلك خواصاً بصرية أو فلورية عن طريق إدخال مجموعات Chromophore أو Fluorophore داخل جزيء المادة المراد تحليلها، مما يسمح بتحليلها بكفاءة باستخدام كاشفي PDA و FLD، أو إدخال مجموعات تعزز التأين وتزيد من كفاءة الكشف عبر كاشف مطياف الكتلة (MS) [5-6]. تُنفذ تفاعلات الاشتقاق في الفصل الكروماتوغرافي بأسلوبين رئيسيين: الاشتقاق قبل عمود الفصل (Pre-column Derivatization) يتم فيه التفاعل بين الكاشف والمادة المراد تحليلها قبل حقن العينة في جهاز HPLC. وهو الأسلوب الأكثر شيوعاً نظراً لبساطته وسهولة التحكم بشروط التفاعل (مثل pH، ودرجة الحرارة، وزمن التفاعل)، كما يمكن تنفيذه يدوياً دون الحاجة إلى تجهيزات خاصة [7]. الاشتقاق بعد عمود الفصل (Post-column Derivatization): يتم التفاعل بعد مرور المادة عبر عمود الفصل، ويتطلب نظام تفاعل متكامل ومتزامن، مما يجعله أكثر تعقيداً وتكلفة، لكنه يُستخدم أحياناً لضمان فصل المركبات قبل الاشتقاق [6].

تعتمد تفاعلات الاشتقاق على كواشف عضوية تُعرف بعوامل الاشتقاق (Derivatizing agents)، تُختار وفقاً للمجموعة الفعالة في المركب الأصلي. وفي حالة الغليفوزات يتم التفاعل غالباً مع مجموعة الأمين. من أبرز الكواشف الكيميائية المستخدمة التي استُخدمت سابقاً لاشتقاق الغليفوزات:

- p-toluenesulphonyl chloride (TsCl): الذي يُستخدم لتشكيل مشتقات ملونة عبر التفاعل مع مجموعة الأمين، ويُحلل بتقانة HPLC مع كاشف UV [8].
- 4-chloro-3,5-dinitrobrnzotrifluoride (CNBF): الذي يُستخدم لتكوين مشتقات يمكن كشفها طيفياً [9].
- 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS): يتفاعل مع المركبات الحاوية على مجموعات أمينية ليعطي مشتقات ملونة [3].
- Amino pyrazine-2 و Aminobenzamide-2: وهما عاملا اشتقاق حديثان نسبياً ويستخدمان مع مركبات متنوعة بما فيها الغليفوزات [10].

• Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC-CL): وهو أكثر الكواشف استخداماً لاشتقاق الغليفوزات، حيث يتفاعل مع مجموعة الأمين الأولية في وسط قلوي ($pH > 8$) لتكوين مشتقات قابلة للكشف بواسطة كاشف PDA أو FLD ويوضح الشكل رقم (2) التفاعل بين الغليفوزات و FMOC-CL. تمتلك المشتقات الناتجة عن التفاعل خصائص قطبية وغير قطبية مستمدة من كل من FMOC-CL والغليفوزات [11]. يُعد هذا التفاعل بسيطاً وسريعاً ومستقرّاً نسبياً، ولهذا أصبح الأكثر اعتماداً في بروتوكولات اشتقاق الغليفوزات [12-14].



شكل (2): تفاعل اشتقاق الغليفوزات بواسطة FMOC-Cl [11].

يُستكمل التحليل بعد الاشتقاق بفصل كروماتوغرافي على أعمدة C18 باستخدام نظام طور متحرك مناسب، غالباً مزيج من الماء والأسيتونتريل أو الميثانول، وقد طُورت طرائق تفصل مشتقات FMOC-glyphosate خلال أقل من 20 دقيقة بدقة وحساسية عالية [12-14].

من الناحية الصحية والبيئية، أثارت الاستخدامات الواسعة للغليفوزات جدلاً علمياً حول تأثيراته السُميّة. فقد أظهرت دراسات عدّة تأثيراته السلبية على الكائنات الحية الدقيقة في التربة [15]، وعلى الكائنات المائية [16-18]. كما بينت دراسات أخرى تأثيره الضار على الجهاز العصبي والسلوك والتكاثر، وارتباطه بمرض باركنسون وبعض أنواع السرطان [19-21]. لذلك، صنّفته الوكالة الدولية لبحوث السرطان (IARC) كمادة يُحتمل أن تكون مسرطنة للبشر (المجموعة A2) [22].

استجابةً لذلك، وُضعت حدود قصوى مسموح بها للآثار المنبغية للغليفوزات في الأغذية والمياه من قبل جهات تنظيمية مختلفة، حيث حددتها وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA) بـ 0.7 mg.L^{-1} ، والكندية بـ 0.28 mg.L^{-1} ، بينما خفّضها الاتحاد الأوروبي إلى $0.1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ وفق التشريع رقم 1071-83-6 [11,23].

بناءً على ما سبق، يُعد تطوير طرائق تحليلية دقيقة لرصد الغليفوزات أمراً ضرورياً، كما أن تحسين طرائق الاشتقاق وفهم تفاعل الكواشف مع الغليفوزات يُشكلان خطوة محورية نحو تطوير طرائق تحليل دقيقة وسريعة تلبّي معايير الرقابة البيئية والصحية الدولية.

أهمية البحث وأهدافه:

نظراً لعدم تحليل الغليفوزات محلياً حتى الآن، يهدف هذا البحث إلى دراسة فعالية كاشف الاشتقاق FMOC-CL عند حلّه بالأسيتونتريل فقط، ومقارنته بفعاليتيه عند حلّه بالأسيتونتريل والماء وذلك في اشتقاق الغليفوزات وتحليله باستخدام تقانة HPLC المزودة بكاشف PDA.

تكمّن أهمية هذا البحث في تحديد المذيب الأنسب لإذابة كاشف FMOC-CL بهدف تحقيق اشتقاق فعّال للغليفوزات، حيث يُعد اختيار المذيب عاملاً حاسماً في نجاح تفاعل الاشتقاق. وبما أن الغليفوزات يذوب في الماء فقط ولا يذوب في معظم المذيبات العضوية، فإن وجود وسط مائي أثناء التفاعل يُعتبر ضرورياً، مما استدعى دراسة فعالية الكاشف عند إذابته في مزيج مائي عضوي. كما يسعى البحث إلى استكشاف إمكانية تقليل استخدام المذيبات العضوية، وذلك لأغراض بيئية واقتصادية، من خلال تقليل التكاليف وتقليل الأثر البيئي المرتبط باستخدام هذه المذيبات.

طرائق البحث ومواده:

1- المواد والمحاليل المستخدمة

- عياري الغليفوزات (نقاوة % 99.2)، من انتاج شركة Sigma-Aldrich الألمانية (part number 45521-250MG).
- كاشف التفاعل FMOC-CL (نقاوة % 99)، من انتاج شركة Biochemika الهندية.
- بوراكس (BORAX POWDER) (Decahydrate Sodium Tetraborate)، صيغته الكيميائية $(Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O)$ ، (نقاوة % 99.5)، من انتاج شركة TM MEDIA الهندية.
- أسيتونتريل (Acetonitrile, CH_3CN) بدرجة نقاوة مخصصة لتحاليل HPLC (HPLC-grad) من انتاج شركة Alpha Chemika الهندية.
- ماء مقطر (HPLC-grad).

2- الأجهزة والأدوات المستخدمة

جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC من نوع ChroZen (انتاج شركة YOUNG IN Chromass Co., Ltd، كوريا الجنوبية)، الموجود في مخبر الشركة الطبية العربية - تاميكو، والمزود بنزاع غازات، حاقن يدوي، مضخة HPLC الرباعية (ChroZen YI9610)، كاشف المصفوفة البيودية الضوئية (PDA Detector, ChroZen YI9660)، فرن عمود (Column Oven, ChroZen YI9630)، وحدة معالجة بيانات الكروماتوغرافيا (YL-Clarity)، وعمود التحليل من نوع C18 ($250mm \times 4.6mm, 5 \mu m$). حمام مائي يعمل بالأمواج فوق الصوتية (Ultrasonic water - bath). ميزان حساس (إنتاج شركة Shimadzu) يزن بدقة ± 0.0001 غرام. جهاز قياس درجة الحموضة (pH-meter)، من انتاج شركة metrohm السويسرية. فلتر غشائية بقطر مسام

KNAUER Wissenschaftliche Geräte من انتاج شركة (Milliporemembrance-filters) 0.45µm GmbH الألمانية.

3-تحضير المحاليل:

- تم تحضير محلول الغليفوزات الأم بحلّه في الماء المقطر للحصول على تركيزين أوليين 500 ppm، 1000 ppm .
- تم تحضير محلول FMOCL- بتريز 0.5 mM، وفق الطريقتين الآتيتين:
أولاً: تم حلّه في الأسيتونتريل فقط في دورق حجمي سعة 25 ml.
- ثانياً: تم حلّه في مزيج من الأسيتونتريل والماء المقطر بنسبة (1:1 - v:v) في دورق حجمي سعة 25 ml.
- تم تحضير محلول الوقاء (Buffer) من رباعي بورات الصوديوم (Sodium tetraborate) بإذابته في المقطر (HPLC grade) للحصول على تركيز 1.25mM، وبدرجة حموضة 9 pH.

4-طريقة الاشتقاق:

أُجري تفاعل اشتقاق الغليفوزات استناداً إلى الطريقة الموضحة في دراسة Pimenta ورفاقه [13] مع إجراء بعض التعديلات، حيث حُضّر تركيزان للغليفوزات (500 ppm , 1000 ppm) وتمّ إضافة 1 ml من كل من المحلولين العياريين كل على حدى إلى 1 ml من المحلول الموقى، ثمّ أُضيف المزيج إلى 1 ml من كاشف التفاعل FMOCL، تُرك المزيج ليتفاعل لمدة ساعة عند درجة حرارة 25°م، ثمّ جرى ترشيحه باستخدام فلتر غشائي 0.45 µm، ثمّ تمّ التحليل باستخدام جهاز HPLC-PDA.

5-شروط التحليل الكروماتوغرافية:

- تمّ اتباع بروتوكول التحليل الذي وضعه Xiao ورفاقه [14] مع اجراء بعض التعديلات في ظروف التشغيل كما يلي:
- كاشف المصفوفة الضوئية PDA مضبوط على طول موجي 206nm.
- حجم الحقنة 20µL.
- معدل تدفق الطور المتحرك 1 ml/min.
- درجة حرارة العمود 25 درجة مئوية.
- الطور المتحرك مكوّن من:
- الطور المائي A: ماء مقطر محمّض بحمض الفوسفور (pH=3).
- الطور العضوي B: أسيتونتريل.

يوضح الجدول رقم (1) برنامج تدرج مُحلّي الطور المتحرك المستخدم في فصل مشتقات الغليفوزات:

جدول (1): تدرج مُحلّي الطور المتحرك أثناء التحليل.

الزمن (دقيقة)	النسبة المئوية للطور المائي (A%)	النسبة المئوية للطور العضوي (B%) (أسيتونتريل)
0	65	35
8	5	95
15	65	35
20	65	35

6-الاجراء

تم تنفيذ العمل البحثي وفق ثلاث مراحل أساسية، بهدف دراسة استقرار كاشف FMOC-CL وفعاليتيه في اشتقاق الغليفوزات، وذلك على النحو التالي:

1. تحليل كاشف FMOC-CL المحلول بالأسيتونتريل فقط:

تم تحضير محلول FMOC-CL المنحل في الأسيتونتريل فقط، ثم جرى تحليله بتقانة HPLC بعد فترات زمنية مختلفة من التحضير، بهدف متابعة القمم الناتجة وتغيرها مع الزمن.

2. تحليل كاشف FMOC-CL المحلول بمزيج من الأسيتونتريل والماء (1:1):

تم تحضير محلول FMOC-CL المنحل في مزيج من الأسيتونتريل والماء بنسبة (1:1 - 7:7) ثم تحليل المحلول بعد أوقات زمنية مختلفة من التحضير، لرصد أي تغيرات في القمم الناتجة بمرور الوقت.

3. دراسة فعالية كاشف FMOC-CL في تفاعل الاشتقاق:

أجري تفاعل اشتقاق الغليفوزات باستخدام كل من المحلولين المحضرين في المرحلتين السابقتين، وذلك لتقييم مدى فعالية كل وسط في تحويل الغليفوزات إلى مشتقاته القابلة للكشف بواسطة HPLC-PDA.

النتائج والمناقشة:

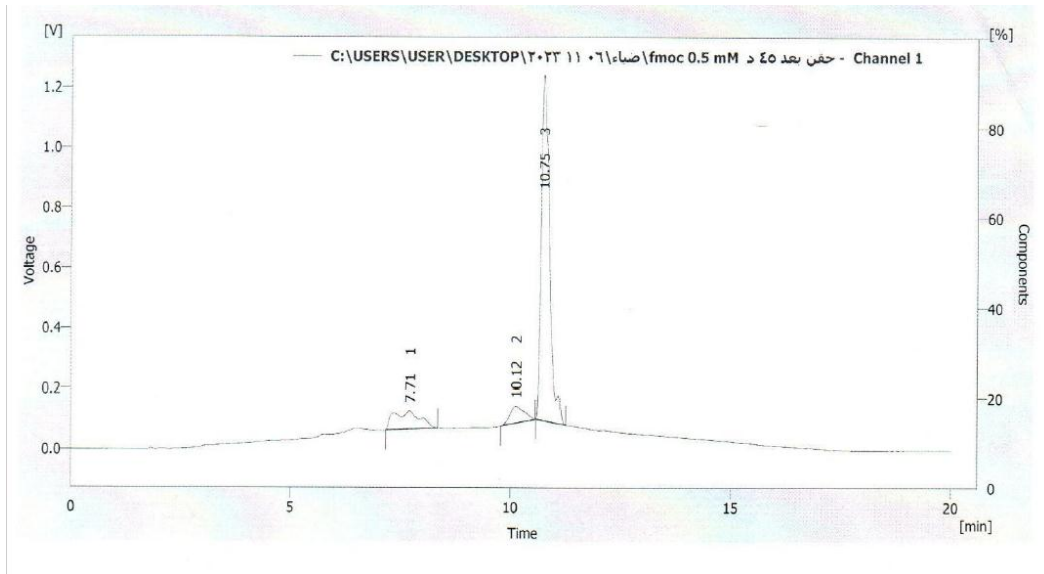
1-دراسة ثباتية الكاشف FMOC-CL عند حله بالأسيتونتريل:

تم تحضير محلول FMOC-CL المنحل في الأسيتونتريل فقط بتركيز 0.5mM ، ثم تم تحليله خلال خمس مكررات (n = 5)، وبعد فترات زمنية مختلفة من التحضير هي 25 min ، 45 min ، 65 min ، 1 day ، 13 day. نتج عن التحليل ظهور ثلاث قمم كروماتوغرافية، موضحة في الجدول رقم (2):

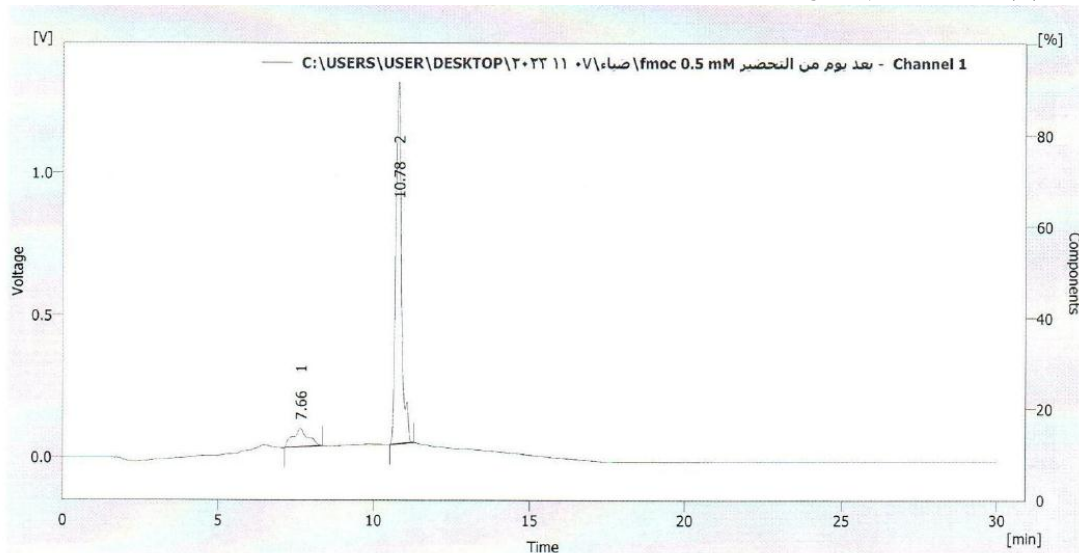
جدول (2): القمم الناتجة عن تحليل كاشف FMOC-CL المنحل بالأسيتونتريل

القمة	($\bar{X} \pm SD$)	
القمة الأولى	7.590 ± 0.230	FMOC-OH هي ناتج التحلل المائي لـ FMOC-CL بسبب الرطوبة وظهرت في جميع التحاليل
القمة الثانية	10.134 ± 0.042	اختفت بعد يوم من التحليل، قد تكون عائدة لشائبة ما
القمة الثالثة	10.742 ± 0.039	FMOC-CL ظهرت في جميع التحاليل
\bar{X} : متوسط زمن الاحتفاظ Retention time لكل قمة (دقيقة)، n=5، SD: الانحراف المعياري		

يبين الشكل رقم (3) الكروماتوغرام الناتج عن التحليل بعد 45 دقيقة من تحضير الكاشف FMOC-CL، في حين يُظهر الشكل رقم (4) الكروماتوغرام الناتج عن التحليل بعد مرور 24 ساعة.

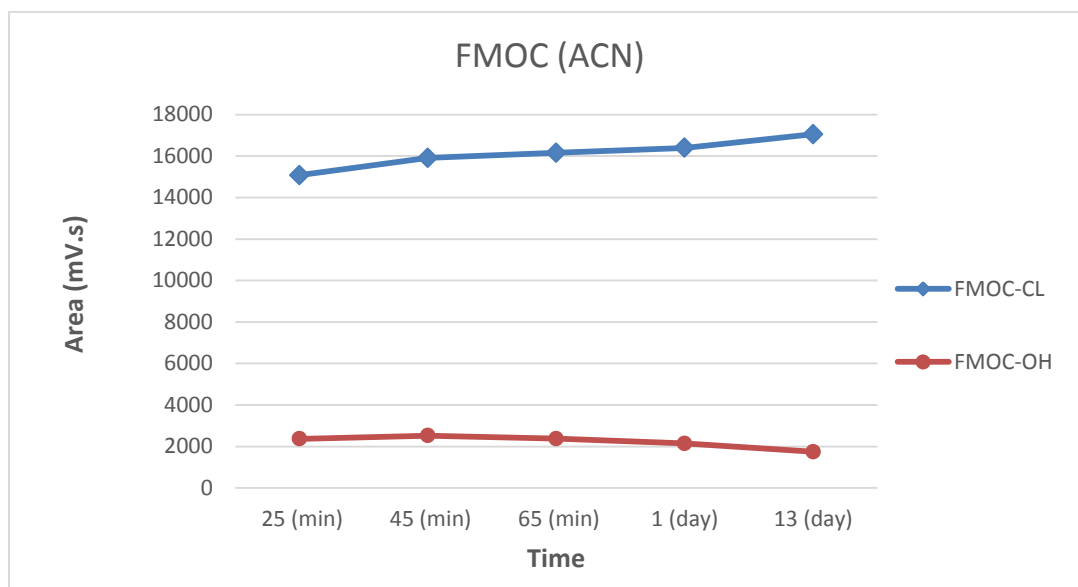


شكل (3): الكروماتوغرام الناتج عن تحليل الكاشف FMOC-CL المحضر بالأسيتونتريل بعد 45 دقيقة من التحضير.



شكل (4): الكروماتوغرام الناتج عن تحليل الكاشف FMOC-CL المحضر بالأسيتونتريل بعد 24 ساعة من التحضير.

يوضح الشكل رقم (5) التمثيل البياني لتغير مساحات القمم لكل من FMOC-OH و FMOC-CL مع مرور الزمن عند إذابة الكاشف في الأسيتونتريل فقط.



شكل (5): التمثيل البياني لتغير مساحات القمم لكل من FMOC-CL و FMOC-OH بدلالة زمن استبقاء الكاشف FMOC-CL بعد حله بالأسيتونتريل.

نلاحظ من خلال المخطط البياني أن كاشف الاشتقاق FMOC-CL يُظهر ثباتاً جيداً لمدة تصل إلى 13 يوماً، حيث استمرت قمة FMOC-CL بالظهور بتركيز مرتفعة في جميع التحاليل، مع ارتفاع طفيف في المساحة بمرور الزمن. في المقابل ظهرت قمة FMOC-OH الناتجة عن التحلل المائي للكاشف في جميع التحاليل، ولكن بتركيز منخفضة ومساحات آخذة بالانخفاض تدريجياً، وهو ما يُعزى إلى تأثر الكاشف برطوبة الهواء أو الرطوبة الموجودة في الأسيتونتريل، أو نسبة الماء الموجودة في الطور المتحرك.

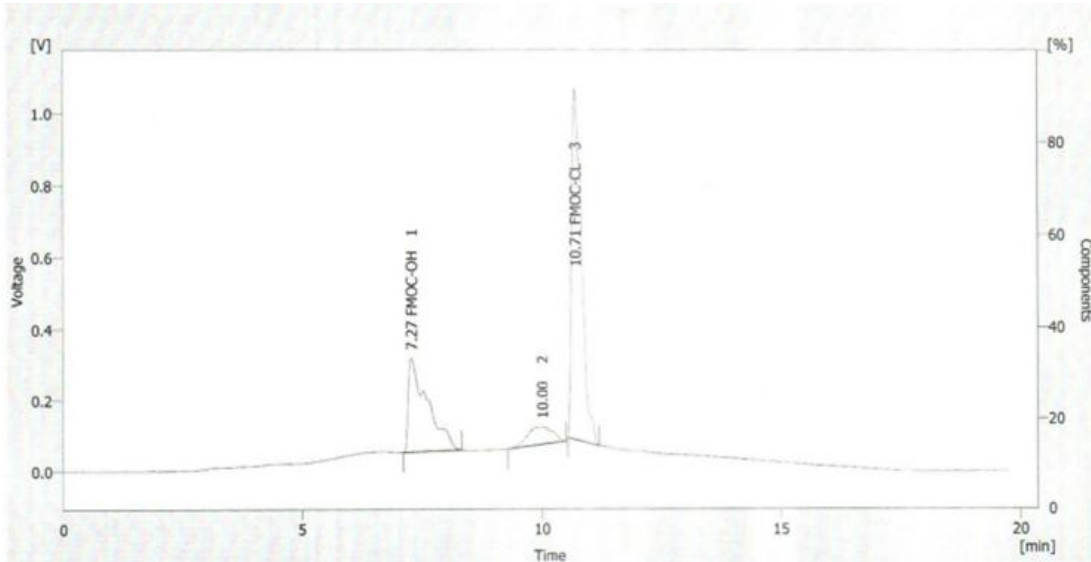
2- دراسة ثباتية الكاشف FMOC-CL عند حله بمزيج من الأسيتونتريل والماء:

تم تحليل الكاشف FMOC-CL المحضّر بتركيز 0.5 mM في مزيج من الأسيتونتريل والماء (1:1 - v:v)، عبر ثمانية مكررات (n = 8)، وبعد فترات زمنية مختلفة من التحضير هي: 15 min، 25 min، 60 min، 85 min، 105 min، 1day، 13 day. وقد أظهرت التحاليل ثلاث قمم كروماتوغرافية موضحة في الجدول رقم (3).

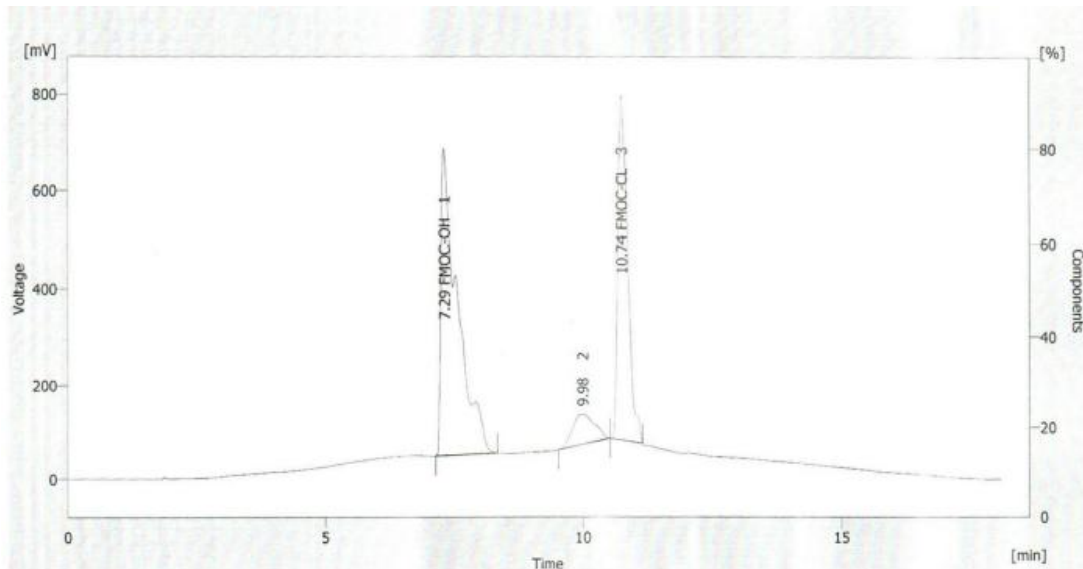
جدول (3): القمم الناتجة عن تحليل كاشف FMOC-CL المنحل في مزيج من الأسيتونتريل والماء.

القمة	($\bar{X} \pm SD$)	الوصف
القمة الأولى	7.297 ± 0.096	FMOC-OH ناتج التحلل المائي، ظهر في جميع التحاليل
القمة الثانية	9.961 ± 0.031	اختفت بعد يوم من التحليل، ويُرجّح أنها تعود عائدة إلى شائبة.
القمة الثالثة	10.716 ± 0.019	FMOC-CL ظهرت في التحاليل الأولى فقط، واختفت بعد يوم واحد
\bar{X} : متوسط زمن الاحتفاظ Retention time (دقيقة)، n=8، SD: الانحراف المعياري		

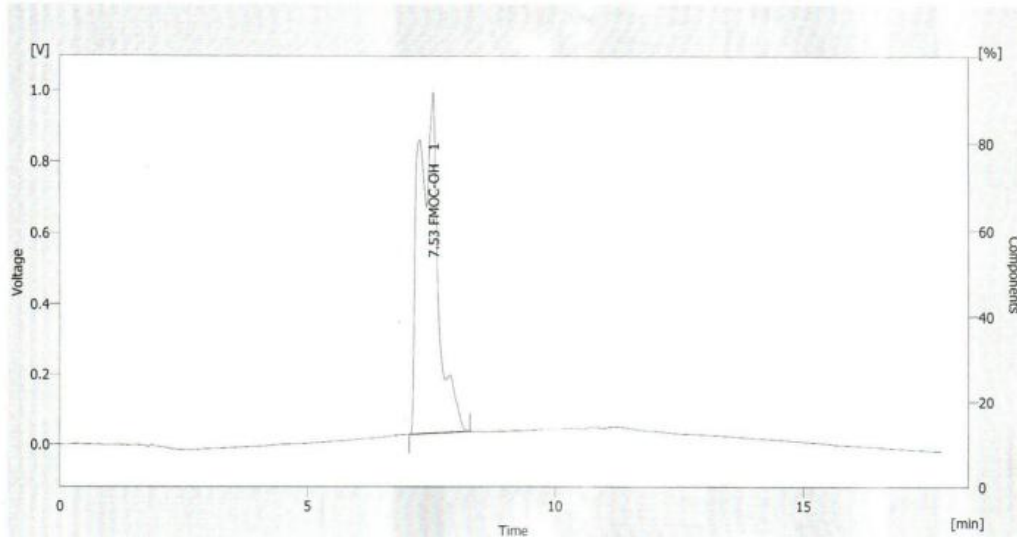
- تُظهر الكروماتوغرامات التالية تطوّر القمم مع زمن استبقاء الكاشف FMOC-CL المنحل في الأسيتونتريل والماء:
- الشكل رقم (4) كروماتوغرام التحليل بعد 25 دقيقة من تحضير الكاشف FMOC-CL.
 - الشكل رقم (5) كروماتوغرام التحليل بعد 125 دقيقة من تحضير الكاشف FMOC-CL.
 - الشكل رقم (6) كروماتوغرام التحليل بعد 24 ساعة من تحضير الكاشف FMOC-CL ، ويبين اختفاء قمة FMOC-CL بشكل كامل.



شكل (6): الكروماتوغرام الناتج عن تحليل الكاشف FMOC-CL المنحل في الأسيتونتريل والماء بعد 25 دقيقة من التحضير.

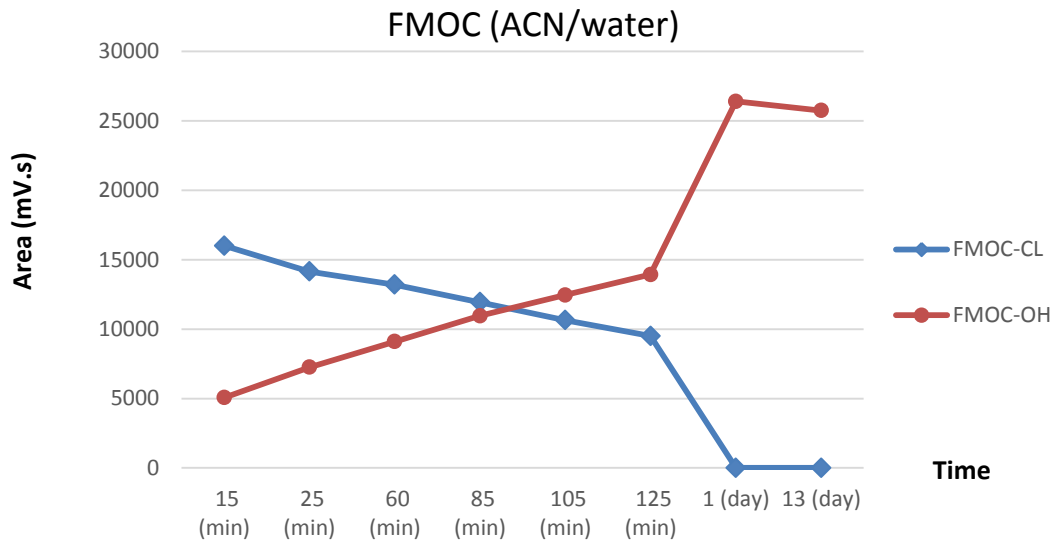


شكل (7): الكروماتوغرام الناتج عن تحليل الكاشف FMOC-CL المنحل في الأسيتونتريل والماء بعد 125 دقيقة من التحضير.

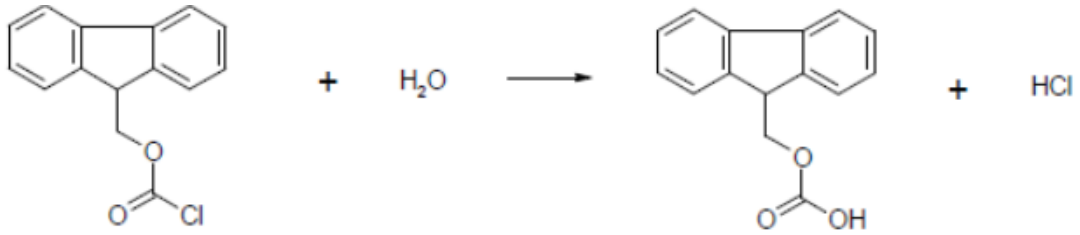


شكل (8): الكروماتوغرام الناتج عن تحليل الكاشف FMOC-CL المنحل في الأسيتونتريل والماء بعد 24 ساعة من التحضير.

يُظهر التمثيل البياني لسلوك قمتي FMOC-CL و FMOC-OH مع زمن استبقاء الكاشف FMOC-CL انخفاضاً في مساحة FMOC-CL وازدياداً في مساحة FMOC-OH بشكل متناظر تماماً، حتى يتحول كاشف التفاعل FMOC-CL كلياً إلى ناتج تحلله المائي FMOC-OH كما يبين الشكل رقم (7). ويعود ذلك إلى التحلل المائي لـ FMOC-CL الذي يتحول في الوسط المائي إلى FMOC-OH كما توضح المعادلة في الشكل رقم (8) [24].



شكل (1): التمثيل البياني لتغير مساحتي قمتي FMOC-CL و FMOC-OH بدلالة زمن استبقاء الكاشف FMOC-CL عند حل الكاشف FMOC-CL في الأسيتونتريل والماء.

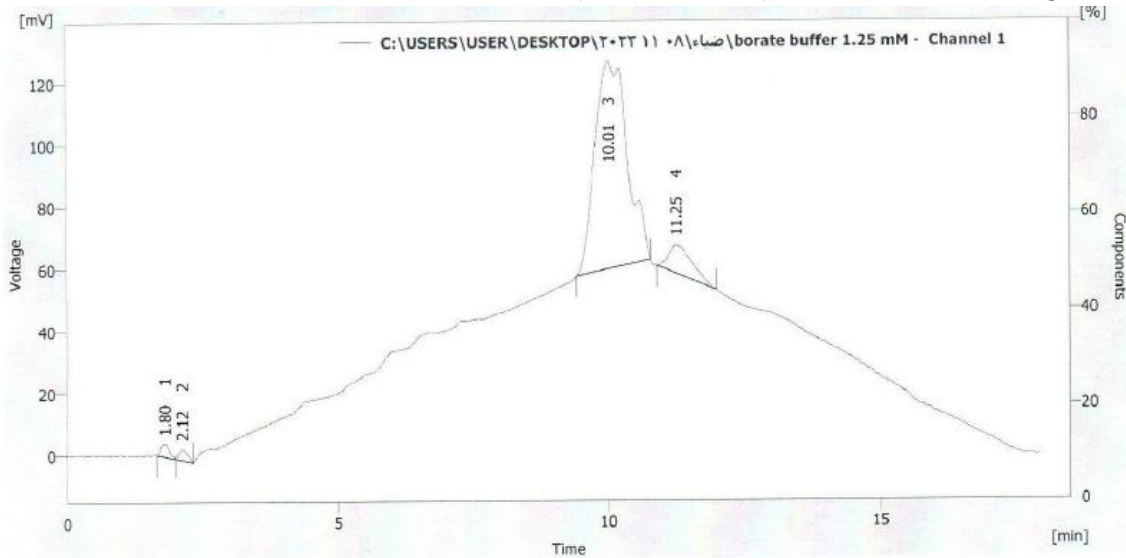


شكل (9): تفاعل التحلل المائي لـ FMOC-CL وتشكل FMOC-OH.

3- تفاعل الاشتقاق:

1.3- تفاعل الاشتقاق باستخدام الكاشف المنحل بالأسيتونتريل فقط:

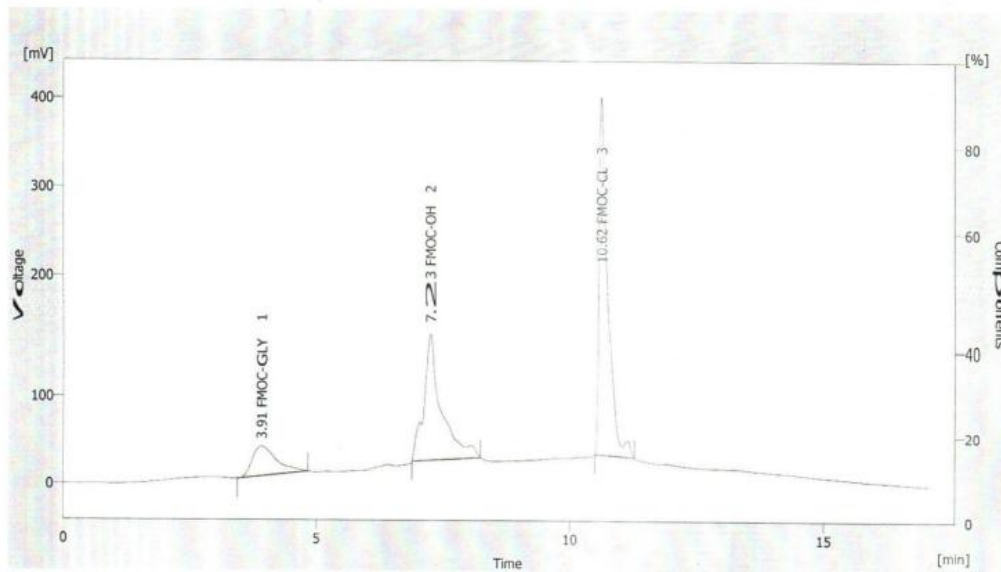
بعد دراسة سلوك الكاشف FMOC-CL، وقبل إجراء تفاعل اشتقاق الغليفوزات، تم تحليل المحلول الموقى (رباعي بورات الصوديوم) بشكل مستقل لفهم تأثيره على استجابة الكاشف PDA دون تفاعل كيميائي. أظهر الكروماتوغرام الناتج الشكل رقم (8) قمة رئيسية عند الدقيقة 10.01، بالإضافة إلى ثلاث قمم صغيرة عند الدقائق 1.8 و 2.12 و 11.25 مع استجابة جهازية منخفضة (أقل من 120 mv).



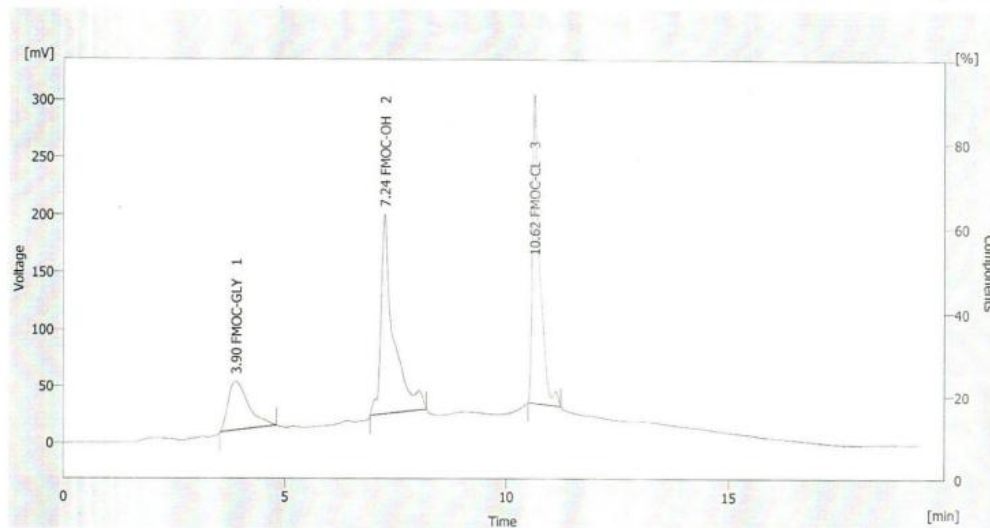
شكل (10): الكروماتوغرام الناتج عن تحليل المحلول الموقى

تمَّ أُجري تفاعل اشتقاق الغليفوزات بإضافة 1 ml من محلول الغليفوزات العياري بتركيز 500 ppm إلى 1 ml من المحلول الموقى، تمَّ أضيف المزيج إلى 1ml من كاشف التفاعل المحضّر بالأسيتونتريل فقط. تُرك الخليط ليتفاعل لمدة ساعة، ثمَّ حُلّل بواسطة تقانة HPLC-PDA. أُعيد التفاعل باستخدام تركيز أعلى للغليفوزات (1000 ppm). أظهرت الكروماتوغرامات الناتجة (الشكلين رقم 9 ورقم 10) ثلاث قمم رئيسية:

- قمة عند الدقيقة 7.2 تعود إلى FMOC-OH.
- قمة عند الدقيقة 10.6 تعود إلى FMOC-CL.
- قمة عند الدقيقة 3.9 تعود إلى مشتق الغليفوزات FMOC-GLY، ما يُثبت فعالية الكاشف المحضّر بالأسيتونتريل في اشتقاق الغليفوزات.



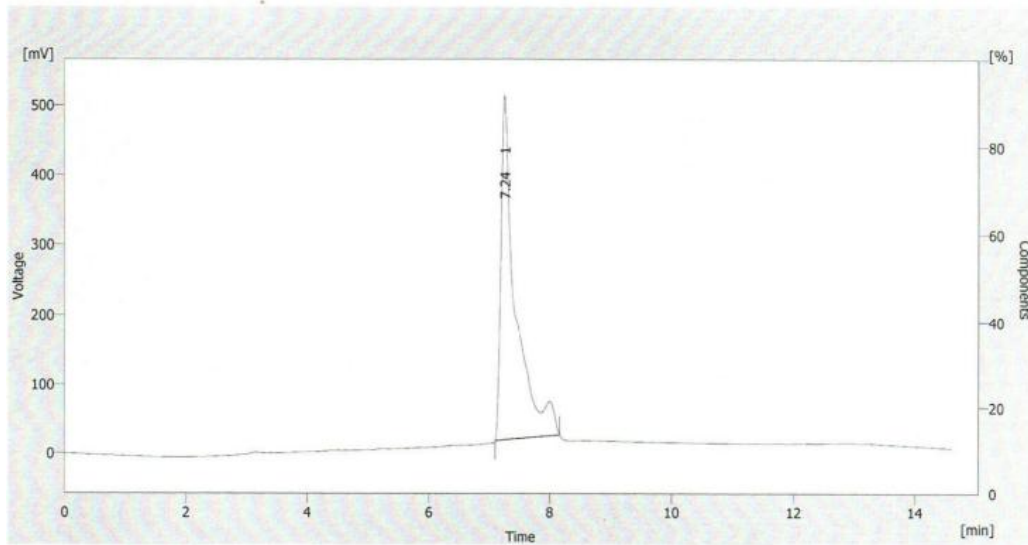
شكل (11): كروماتوغرام تحليل الغليفوزات 500 ppm بعد الاشتقاق بـ FMO-CL المنحل بالأسيتونتريل.



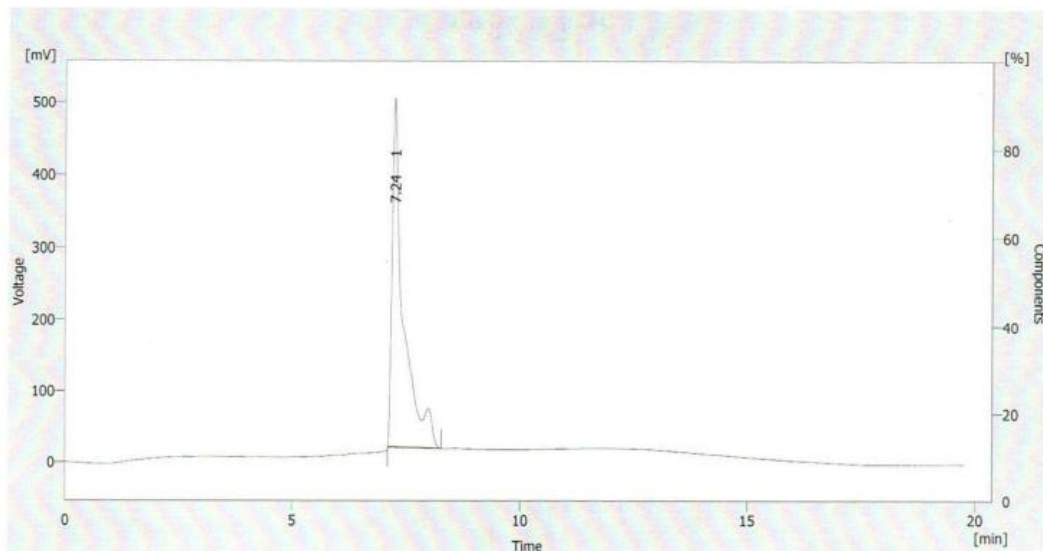
شكل (12): كروماتوغرام تحليل الغليفوزات 1000 ppm بعد الاشتقاق بـ FMO-CL المنحل بالأسيتونتريل.

2.3 - تفاعل الاشتقاق باستخدام الكاشف المحضّر بالأسيتونتريل والماء:

عند تنفيذ تفاعل الاشتقاق باستخدام كاشف FMO-CL المنحل بمزيج من الأسيتونتريل والماء، لم تظهر قمة مشتق الغليفوزات FMO-Gly في الكروماتوغرام، مما يدل على أن الكاشف فقد فعاليته نتيجة تحلله إلى FMO-OH وقد ظهرت في التحاليل فقط قمة FMO-OH، كما هو موضح في الشكلين رقم 11 ورقم 12.



شكل (13): كروماتوغرام تحليل الغليفوزات 500 ppm بعد الاشتقاق بـ FMOC-CL المنحل بالأسيتونتريل والماء.



شكل (14): كروماتوغرام تحليل الغليفوزات 1000 ppm بعد الاشتقاق بـ FMOC-CL المنحل بالأسيتونتريل والماء.

يتضح من النتائج أن نجاح تفاعل اشتقاق الغليفوزات يعتمد بشكل حاسم على وسط إذابة كاشف FMOC-CL. وعلى الرغم من أن تفاعل الاشتقاق يتطلب توافر وسط مائي وعضوي، إلا أنه لا يمكن استخدام مزيج من الأسيتونتريل والماء كمذيب لكاشف FMOC-CL وذلك بسبب تحلله السريع.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

تبين من خلال هذه الدراسة أن ثباتية كاشف FMOC-CL تتأثر بشكل مباشر بوسط الإذابة، إذ يحافظ الكاشف على فعاليته لمدة تصل إلى 13 يوماً عند إذابته في الأسيتونتريل فقط، في حين يؤدي وجود الماء ضمن الوسط إلى تحلله

السرّيع خلال أقل من يوم واحد إلى ناتج التحلل المائي Fmoc-OH. وقد انعكس ذلك بوضوح على كفاءة تفاعل الاشتقاق، حيث أظهر الكاشف المذاب بالأسيتونتريل قدرة عالية على اشتقاق الغليفوزات مع ظهور قمة المشتق Fmoc-GLY عند الدقيقة 3.9، بينما لم يتم الحصول على أي إشارة عند استخدام المزيج المائي. وتشير هذه النتائج مجمعة إلى أن التحكم الدقيق بوسط الإذابة يعد عاملاً أساسياً لضمان نجاح عملية الاشتقاق وتحقيق فصل كروماتوغرافي موثوق، كما أن إمكانية تخزين الكاشف Fmoc-CL في الأسيتونتريل لفترة زمنية مناسبة تمثل ميزة عملية تقلل من الحاجة إلى تحضير متكرر. علاوة على ذلك، فإن رصد قمة Fmoc-OH يوفر وسيلة لمتابعة استقرار الكاشف أثناء التخزين، مما يعزز موثوقية الطريقة ويؤهلها للتطبيق في التحاليل البيئية والبيولوجية المستقبلية.

التوصيات:

- يوصى باستخدام الأسيتونتريل النقي كمذيب أساسي لتحضير كاشف Fmoc-CL عند إجراء اشتقاق الغليفوزات، مع ضرورة تجنّب أي تلوث مائي لضمان كفاءة التفاعل واستقرار الكاشف.
- عند إجراء تفاعل الاشتقاق يُنصح بإضافة الكاشف Fmoc-CL في الخطوة الأخيرة لتفادي تحلله قبل بدء التفاعل مع الغليفوزات.
- يوصى بتجريب مذيبات عضوية أخرى كمذيبات بديلة للكاشف ودراسة فعاليتها في تحسين عملية الاشتقاق.
- يوصى بدراسة الزمن الأمثل لتفاعل الاشتقاق لتحقيق التوازن بين تشكّل المشتق Fmoc-GLY وناتج التحلل المائي Fmoc-OH.
- يوصى بدراسة درجة الحموضة المناسبة لتفاعل الاشتقاق بهدف تقليل تكوّن Fmoc-OH وزيادة كفاءة تكوين Fmoc-GLY.
- يوصى بدراسة تأثير تراكيز مختلفة من Fmoc-CL على كفاءة الاشتقاق للوصول إلى الظروف المثلى للتفاعل.
- توسيع تطبيق الطريقة ليشمل الكشف المتزامن عن الغليفوزات وناتج تحلله AMPA في عينات بيئية وبيولوجية متنوعة.
- مقارنة أداء Fmoc-CL مع كواشف اشتقاق أخرى من حيث الحساسية والثباتية والانتقائية لتطوير طرائق تحليلية أكثر دقة وموثوقية.

References:

- [1] Agricultural Media Center, *Pesticide Guide in Syria*, Damascus, (in Arabic), 2016.
- [2] C. Vélot, F. Poitou, and J. S. de Vendôme, Comparative analysis of detection techniques for glyphosate in urine and in water, *Environmental Sciences Europe*, vol. 34, no. 1, 59, 2022.
- [3] G. Islas, J. A. Rodriguez, L. H. Mendoza-Huizar, F. Pérez-Moreno, and E. G. Carrillo, Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soils by HPLC with pre-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 37, no. 9, pp. 1298–1309, 2014.
- [4] L. Sun, D. Kong, W. Gu, X. Guo, W. Tao, Z. Shan, et al., Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, vol. 1502, pp. 8–13, 2017.
- [5] O. A. Adegoke, An overview of applications of pre-column derivatization reactions for the liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals and other compounds, *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, vol. 6, no. 14, pp. 129–140, 2012.

- [6] V. David, S. C. Moldoveanu, and T. Galaon, "Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis," **Biomedical Chromatography**, vol. 35, no. 1, e5008, 2021.
- [7] Y. Zhang, Y. Zhang, Q. Qu, G. Wang, and C. Wang, Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soybean samples by high performance liquid chromatography using a novel fluorescent labeling reagent, *Analytical Methods*, vol. 5, no. 22, pp. 6465–6472, 2013.
- [8] M. V. Khrolenko and P. P. Wiczorek, Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride, *Journal of Chromatography A*, vol. 1093, no. 1–2, pp. 111–117, 2005.
- [9] K. Qian, T. Tang, T. Shi, F. Wang, J. Li, and Y. Cao, Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride, *Analytica Chimica Acta*, vol. 635, no. 2, pp. 222–226, 2009.
- [10] H. Alyuruk, A. Kontas, and O. Altay, A comparative study of two HPLC methods for dissolved monosaccharide analysis in seawater using 2-amino benzamide and 2-amino pyrazine as pre-column derivatization reagents, *Talanta*, vol. 234, 122629, 2021.
- [11] J. Garba, R. Othman, and M. S. Ahmad-hamdani, "Simplified method for derivatization of extractable glyphosate and aminomethylphosphonic acid and their determination by high performance liquid chromatography," **Environmental Research and Technology**, vol. 1, no. 2, pp. 19–30, 2018.
- [12] I. Hanke, H. Singer, and J. Hollender, Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, pp. 2265–2276, 2008.
- [13] E. M. Pimenta, F. F. D. Silva, É. S. Barbosa, A. P. Cacique, D. L. Cassimiro, G. P. D. Pinho, and F. O. Silvério, Quantification of glyphosate and AMPA by HPLC-ICP-MS/MS and HPLC-DAD: A comparative study, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 31, pp. 298–304, 2020.
- [14] R. Xiao, B. Kuang, Y. Hu, Y. Wang, J. Bai, L. Zhang, et al., Ecological risk assessment of glyphosate and its possible effect on bacterial community in surface sediments of a typical shallow lake, northern China, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 249, 114445, 2023.
- [15] J. G. D. C. Marques, K. J. D. S. Veríssimo, B. S. Fernandes, S. R. D. M. Ferreira, S. M. G. L. Montenegro, and F. Motteran, Glyphosate: A review on the current environmental impacts from a Brazilian perspective, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 107, no. 3, pp. 385–397, 2021.
- [16] G. Fernandes, V. C. Aparicio, M. C. Bastos, E. De Gerónimo, J. Labanowski, O. D. Prestes, et al., Indiscriminate use of glyphosate impregnates river epilithic biofilms in southern Brazil, *Science of the Total Environment*, vol. 651, pp. 1377–1387, 2019.
- [17] L. de Brito Rodrigues, G. G. Costa, E. L. Thá, L. R. da Silva, R. de Oliveira, D. M. Leme, et al., Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 842, pp. 94–101, 2019.

- [18] N. Corrales, M. Meerhoff, and D. Antoniadis, Glyphosate-based herbicide exposure affects diatom community development in natural biofilms, *Environmental Pollution*, vol. 284, 117354, 2021.
- [19] M. Eriguchi, K. Iida, S. Ikeda, M. Osoegawa, K. Nishioka, N. Hattori, et al., Parkinsonism relating to intoxication with glyphosate, *Internal Medicine*, vol. 58, no. 13, pp. 1935–1938, 2019.
- [20] L. Serra, A. Estienne, C. Vasseur, P. Froment, and J. Dupont, Mechanisms of glyphosate and glyphosate-based herbicides action in female and male fertility in humans and animal models, *Cells*, vol. 10, no. 11, 3079, 2021.
- [21] C. Costas-Ferreira, R. Durán, and L. R. Faro, Toxic effects of glyphosate on the nervous system: A systematic review, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 9, 4605, 2022.
- [22] IARC Working Group, *IARC Monographs, Vol. 112: Some Organophosphate Insecticides and Herbicides*, Lyon, 3–10 March 2015.
- [23] T. Arraj, *Conception d'un système d'élimination du glyphosate des eaux de drainage agricole*, Thèse de doctorat, Université de Lorraine, 2015.
- [24] M. V. Ciocilteu, P. Podgoreanu, C. Delcaru, M. C. Chifiriuc, and C. V. Manda, PLGA-Gentamicin biocomposite materials with potential antimicrobial applications in orthopedics, *Farmacia*, vol. 67, no. 4, pp. 580–586, 2019.

