

Validation of an Optimized HPLC-FLD Method for the Simultaneous Determination of Glyphosate and AMPA with Application to Environmental Water Samples

Diaa Ali* 

Dr. Tareq Arraj**

Dr. Hajar Nasser***

(Received 25 / 5 / 2026. Accepted 12 / 7 / 2026)

□ ABSTRACT □

This study presents the validation of an optimized analytical method for the highly sensitive simultaneous determination of glyphosate and its primary degradation product AMPA using HPLC with fluorescence detection following FMOC-Cl derivatization, and its application to environmental water samples. Derivatization conditions were optimized at pH 10.5 with a reaction time of 45 min and an FMOC-Cl concentration of 8 μ M. Chromatographic separation was achieved using a mobile phase consisting of acetonitrile and sodium acetate buffer (20 mM, pH 5.2) in a 50:50 (v/v) ratio, with fluorescence detection at 265/310 nm. Method validation, performed according to ICH Q2(R1) guidelines, demonstrated excellent selectivity and linearity ($r^2 \geq 0.999$) over concentration ranges of 0.88–56.36 ppb for glyphosate and 0.58–37.01 ppb for AMPA. Recoveries ranged from 92.38–103.92% and 87.19–105.24%, respectively, with good precision (RSD <2% for repeatability and <5% for intermediate precision). Limits of detection were 3.9 and 1.7 ppt, while limits of quantification were 12 and 5 ppt for glyphosate and AMPA, respectively. Application to environmental water samples confirmed the presence of both analytes in agricultural surface waters, highlighting the method's reliability and suitability for trace-level environmental monitoring.

Keywords: Glyphosate, AMPA, HPLC-FLD, FMOC-Cl derivatization, analytical method validation

Copyright



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

* PhD Student, Higher Institute for Environmental Research- Latakia University(formerly Tishreen) Latakia , Syria. diaa.ali@latakia-univ.edu.sy,

** Assistant Professor - Higher Institute for Environmental Research - Latakia University(formerly Tishreen) - Syria. arrajtareq@yahoo.com

***Professor- Faculty of Science - Latakia University(formerly Tishreen) - Syria. hajar.n.nasser@gmail.com

التحقق من صحة طريقة تحليلية مُحسَّنة باستخدام HPLC-FLD للتقدير المتزامن للغليفوزات و AMPA وتطبيقها على عينات مياه بيئية

ضياء علي* 

د. طارق عراج**

د. هاجر ناصر***

(تاريخ الإيداع 2026 / 5 / 25. قبل للنشر في 2026 / 7 / 12)

□ ملخص □

تهدف هذه الدراسة إلى التحقق من صحة طريقة تحليلية مُحسَّنة للتقدير المتزامن عالي الحساسية للغليفوزات وناتج تحليله الرئيس AMPA باستخدام HPLC-FLD بعد الاشتقاق (قبل العمود) بكاشف FMOC-Cl، مع تطبيقها على عينات مائية بيئية. تم تحديد الشروط المثلى للاشتقاق عند $\text{pH} = 10.5$ وزمن تفاعل 45 min وتركيز FMOC-Cl مقداره $8 \mu\text{M}$ ، مع فصل كروماتوغرافي باستخدام طور متحرك من الأسيتونتريل ومحلول منظم من خلات الصوديوم (20 mM ، $\text{pH} = 5.2$) بنسبة (50:50، v/v)، والكشف عند أطوال موجية للإثارة والانبعاث 265/310 nm. أظهرت النتائج وفق إرشادات ICH Q2(R1) انتقائية عالية وخطية ممتازة ($r^2 = 0.999$) ضمن المجال ppb (0.88 – 56.36) للغليفوزات و (0.58 – 37.01) ppb لـ AMPA. تراوحت نسب الاسترجاع بين 92.38 – 103.92% و 87.19 – 105.24%)، مع دقة جيدة تمثلت بقيم RSD% أقل من 2% للتكرارية وأقل من 5% للدقة المتوسطة. بلغت حدود الكشف (3.9 و 1.7) ppt، وحدود التقدير الكمي (12 و 5) ppt للغليفوزات و AMPA على الترتيب. عند تطبيق الطريقة على عينات مياه بيئية، تم الكشف عن المركبين في مياه سطحية زراعية بتركيز 38.15 ppb للغليفوزات و 26.60 ppb لـ AMPA، مما يؤكد كفاءة الطريقة وحساسيتها العالية للرصد البيئي عند التراكيز المنخفضة، ويجعلها أداة موثوقة للدراسات الرقابية.

الكلمات المفتاحية: الغليفوزات، AMPA، HPLC-FLD، FMOC-Cl، التحقق من صحة الطريقة التحليلية.

حقوق النشر : مجلة جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً) - سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب
الترخيص CC BY-NC-SA 04 

* طالبة دكتوراه - المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً)، اللاذقية ، سورية.

diaa.ali@latakia-univ.edu.sy

** مدرس - المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً)، اللاذقية، سورية. arrajtareq@yahoo.com

*** أستاذ - كلية العلوم - جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً)، اللاذقية ، سورية. hajar.n.nasser@gmail.com

مقدمة

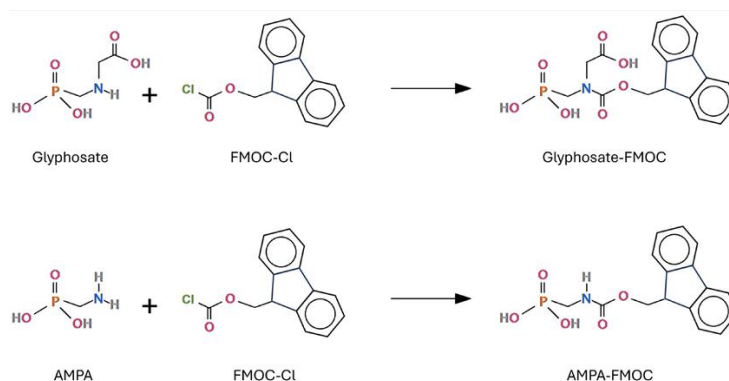
شهدت الزراعة الحديثة زيادة كبيرة في استخدام مبيدات الأعشاب لتعزيز الإنتاجية، ويُعد الغليفوزات Glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] أكثرها انتشاراً عالمياً منذ تطويره في سبعينيات القرن الماضي [1]. يتميز هذا المبيد بقطبيته العالية، وتحلله الحيوي إلى ناتج رئيس هو AMPA (Aminomethylphosphonic acid)، الذي يتمتع بثبات بيئي أعلى [2]. حيث يتراوح نصف العمر البيئي للغليفوزات بين بضعة أيام وعدة أشهر تبعاً لخصائص التربة والمياه والظروف البيئية المحيطة، بينما يُعد AMPA مؤشراً مهماً للتلوث طويل الأمد [3-5].

وعلى الرغم من الذوبانية العالية لكلا المركبين في الماء، فإن سلوكهما البيئي يخضع لتوازن معقد بين الامتزاز على مكونات التربة والتحلل الحيوي، يتميز الغليفوزات و AMPA عادة بقدرة منخفضة على الانتقال إلى المياه الجوفية بسبب ارتباطهما القوي بالمكونات المعدنية والعضوية للتربة، إلا أن ظروفًا بيئية معينة (مثل انخفاض محتوى المادة العضوية، وشدة الري أو الهطول) قد تعزز انتقالهما عبر الجريان السطحي أو الرش إلى المياه السطحية والجوفية [2، 6-7]. كما أشارت العديد من الدراسات إلى وجود آثار متبقية من الغليفوزات و AMPA في المياه والغذاء، مما يثير مخاوف جدية بشأن التعرض المزمن منخفض التركيز وتأثيراته التراكمية [3، 8-9].

أُعتد سابقاً أن الغليفوزات منخفضة السمية تجاه الكائنات غير المستهدفة [10]، إلا أن الأدلة العلمية الحديثة أظهرت وجود مخاطر صحية محتملة مرتبطة بالتعرض المزمن له، تشمل الإجهاد التأكسدي، والسمية الخلوية والجينية، واضطراب التوازن الهرموني، إضافة إلى تأثيرات محتملة على الجهاز العصبي والمناعي، وتأثيرات على الصحة الإنجابية [11-15]. وقد صنّفت الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) الغليفوزات عام 2015 ضمن المجموعة A2 (مادة محتملة السرطنة للإنسان) [16]. وانعكاساً لهذه المخاوف، حددت الهيئات التنظيمية حدوداً قصوى لتراكيزه في مياه الشرب: 0.7 mg/L من قبل وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA)، و 0.28 mg/L من قبل وزارة الصحة الكندية، بينما اعتمد الاتحاد الأوروبي حداً أكثر صرامة قدره 0.1 µg/L [17-18].

في سوريا، يُستخدم الغليفوزات على نطاق واسع كمادة فعالة في العديد من المبيدات المسجلة [19]. وعلى الرغم من استخدامه المكثف، لا توجد حتى الآن طريقة تحليلية معتمدة محلياً لتقديره، مما يستدعي تطوير طرائق تحليلية دقيقة وحساسة لمراقبة آثاره المتبقية في الأوساط البيئية والغذائية.

تواجه عملية تحليل الغليفوزات و AMPA تحديات تقنية ناتجة عن قطبيتهما الشديدة، وذوبانيتهما العالية في الماء، وغياب المجموعات الكروموفورية والفلورية في بنيتهما، مما يحد من فعالية الكشف المباشر باستخدام تقانات الكروماتوغرافيا التقليدية [20-21]. لذلك يُعد الاشتقاق الكيميائي Derivatization خطوة أساسية لتحسين إمكانية الكشف الكيفي والكمي لهذين المركبين، من خلال تحويلهما إلى مشتقات أكثر استجابة للكشف الطيفي أو الفلوري [22-23]. ويُعد كاشف FMOC-Cl من أكثر الكواشف استخداماً في اشتقاق الغليفوزات و AMPA، إذ يتفاعل مع مجموعة الأمين في كلا المركبين ضمن وسط قلوي، ليشكل مشتقات فلورية مستقرة نسبياً قابلة للكشف بتقانة الكروماتوغرافيا السائلة مع كاشف PDA أو FLD [10]، ويوضح الشكل (1) تفاعل الاشتقاق بين كل من الغليفوزات و AMPA مع FMOC CL.



الشكل (1): تفاعل اشتقاق الغليفوزات و AMPA باستخدام كاشف FMOC-Cl [24]

تُعد تقانة HPLC-FLD بعد الاشتقاق من الطرائق الحساسة والمناسبة لتحليل الآثار المتبقية للغليفوزات و AMPA. ومع ذلك، تُظهر الدراسات المنشورة تبايناً ملحوظاً في شروط الاشتقاق والتحليل الكروماتوغرافي (تركيز كاشف الاشتقاق، نوع الطور المتحرك، قيمة pH، درجة حرارة العمود، وأطوال الموجات). يوضح الجدول (1) مقارنة بين أبرز الدراسات السابقة التي اعتمدت على اشتقاق FMOC-Cl مع التحليل بتقانة HPLC-FLD.

الجدول (1): مقارنة بين أبرز الدراسات السابقة التي اعتمدت على اشتقاق

HPLC-FLD مع التحليل بتقانة FMOC-Cl

المرجع	الكاشف FMOC-Cl	المحلول المنظم borate buffer	زمن الاشتقاق min	الطور المتحرك	التدفق mL/min	درجة حرارة العمود °C	أطوال الموجات انبعاث/إثارة nm
[25]	1 g/L	0.05 M	240	أسيتونتريل : حمض الفوسفوريك gradient - (0.2%)	1.0	35	254/301
[18]	0.02 M	0.05 M pH 9	60	أسيتونتريل : KH_2PO_4 (0.05 M) (30:70) isocratic	0.7	40	270/315
[26]	0.02 M	0.05 M	60	أسيتونتريل : KH_2PO_4 (0.05 M) (30:70) isocratic	0.7	40	210/315
[27]	6 g/L	25 mM	60	أسيتونتريل : خلات الأمونيوم gradient - (5 mM, pH 9.5)	1.0	30	270/315
[28]	160 mg/L	0.04 M pH 9	30	أسيتونتريل : حمض الفوسفوريك gradient - (0.05%, pH 9.5)	1.0	-	260/317
[29]	1.59 g/L	200 mM 8.98 pH	60	ميثانول : خلات الأمونيوم gradient - (5mM, pH 8.9)	1.0	25	265/315

في ظل هذا التباين في شروط الاشتقاق والتحليل الكروماتوغرافي، وما يرافقه من اختلاف في الأداء التحليلي وصعوبة إعادة تطبيق الطرائق تحت ظروف مخبرية مختلفة، تمّ في مرحلة سابقة من هذا البحث تحسين شروط الاشتقاق والفصل الكروماتوغرافي بتقانة HPLC-FLD للكشف المتزامن عن الغليفوزات و AMPA. لكن اعتماد الطرائق التحليلية المحسنة في التحاليل الروتينية والرقابية لا يتم بدون التأكد من صحة الطريقة (Method Validation).

يهدف الجزء الحالي من الدراسة إلى التحقق الكامل من صحة الطريقة التحليلية المُحسَّنة وفق إرشادات المؤتمر الدولي للمواصفة (ICH Q2(R1) [30])، وتطبيقها على عينات مياه بيئية حقيقية لتقييم أدائها في المصفوفات الواقعية. وشمل

التحقق تقييم اختبار ملائمة النظام (System Suitability Test, SST)، والانتقائية (Specificity)، والخطية والمدى (Linearity and Range)، والصحة (Accuracy)، والدقة (Precision) بما في ذلك التكرارية (Repeatability) والدقة المتوسطة (Intermediate Precision)، إضافة إلى حدود الكشف (LOD) والتقدير الكمي (LOQ)، والمتانة (Robustness).

أهمية البحث وأهدافه:

تتبع أهمية هذه الدراسة من الحاجة إلى اعتماد طريقة تحليلية موثوقة لتقدير مبيد الأعشاب الغليفوزات وناتج تحلله الرئيس (AMPA) في الأوساط البيئية، ولا سيما في ظل الاستخدام الواسع لهذا المبيد وغياب طرائق تحليلية مطبقة محلياً لرصده. وتكتسب هذه الدراسة أهميتها من كونها توفر منهجاً تحليلياً قائماً على تقانة HPLC-FLD بعد الاشتقاق بكاشف FMOC-Cl، يتميز بالحساسية والانتقائية وإمكانية التطبيق ضمن الإمكانيات المتاحة في المختبرات المحلية. تهدف الدراسة إلى:

1. التحقق الكامل من صحة الطريقة التحليلية المُحسَّنة للتقدير المتزامن للغليفوزات وAMPA وفق إرشادات المؤتمر الدولي للمواءمة (ICH Q2(R1)، من خلال تقييم جميع معايير الأداء التحليلي الأساسية، والتي تشمل: الانتقائية، الخطية والمدى، الصحة (الاسترجاع)، الدقة (التكرارية والدقة المتوسطة)، حدود الكشف (LOD) وحدود التقدير الكمي (LOQ)، ومتانة الطريقة.
2. إثبات قدرة الطريقة على الكشف عن متبقيات الغليفوزات وAMPA عند مستويات تركيز منخفضة، بما يدعم استخدامها في برامج الرصد البيئي والتحليل الروتينية والرقابية في سوريا.
3. تطبيق الطريقة المتحقق من صحتها على عينات مياه بيئية حقيقية لتقييم كفاءتها في المصفوفات الواقعية.

طرائق البحث ومواده:

1. المواد المستخدمة

استُخدم عيار الغليفوزات بنقاوة 99.2 % (رقم المنتج: 45521-250MG) وعيار AMPA بنقاوة 99 % (رقم المنتج: 324817-250MG)، وكلاهما من إنتاج شركة Sigma-Aldrich (ألمانيا)، كما استُخدم كاشف FMOC-CL بنقاوة 99% من إنتاج شركة BIOCHEMIKA (الهند). أُعدت المحاليل المنظمة باستخدام بورات الصوديوم المائية ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) من شركة TM MEDIA (الهند). وخلات الصوديوم ثلاثي الهيدرات ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) من شركة Qualikems Lifesciences (الهند). استُخدم حمض الخليك والأسيتونتريل من الدرجة التحليلية العالية (HPLC-grade)، وماء ثنائي التقطير منزوع الأيونات من شركة TM MEDIA (الهند).

2. الأجهزة والأدوات المستخدمة

أُجريت التحاليل باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC من شركة Shimadzu (اليابان)، والموجود في مخابر المعهد العالي لبحوث البيئة- جامعة اللاذقية. والمزود بوحدة نازع غازات، مضخة ثنائية الطور (LC-20AT)، حاقن آلي (SIL-20A)، كاشف فلورة (RF-10AXL)، ووحدة تحكم (CBM-20A)، تمت معالجة البيانات ببرمجية LCsolution. استُخدم عمود فصل كروماتوغرافي من نوع C18 بأبعاد (250mm × 4.6mm, 5 µm) من إنتاج شركة Wissenschaftliche Gerätebau (ألمانيا).

كما استخدم حمام مائي يعمل بالأمواج فوق الصوتية (Ultrasonic Water Bath)، ميزان تحليلي حساس (± 0.0001 g) من Shimadzu، جهاز قياس pH من Metrohm (سويسرا). قمع بوخنر مع مضخة تخلية، فلاتر غشائية بقطر مسام $0.45 \mu\text{m}$ ، وفلاتر حقنية Millipore بقطر مسام $0.45 \mu\text{m}$ من شركة KNAUER (ألمانيا).

3. تحضير المحاليل العيارية

حُضِرَ محلول عياري أساسي لكل من الغليفوزات و AMPA بتركيز 100 mg/L (100 ppm) بإذابة الكمية المناسبة من كل عيار في ماء منزوع الأيونات (HPLC-grade). حُضِرَت محاليل العمل بالتخفيف التسلسلي باستخدام نفس الماء. حُفِظَت جميع المحاليل العيارية في زجاجات غامقة محكمة الإغلاق عند 4°C .

حُضِرَ محلول كاشف FMOCl الأساسي بتركيز 0.5 mM في الأسيتونتريل (HPLC-grade) وحُفِظَ في وعاء محكم بعيداً عن الرطوبة، ثم حُفِظَ إلى التركيز المطلوب ($8 \mu\text{M}$) مباشرة قبل الاستخدام. أُعِدَّت المحاليل المنظمة كالاتي:

- محلول رباعي بورات الصوديوم (1 mM ، 10.5 pH) في ماء منزوع الأيونات، ويُستخدم في خطوة الاشتقاق.
- محلول خلاص الصوديوم (20 mM ، 5.2 pH) بإذابة خلاص الصوديوم ثلاثي الهيدرات في الماء، وضبط الحموضة بحمض الخليك، ويُستخدم في تحضير الطور المتحرك.

4. إجراءات الاشتقاق والتحليل الكروماتوغرافي

4.1. الاشتقاق الكيميائي

تم تحسين شروط الاشتقاق من خلال دراسة منهجية لتأثير زمن التفاعل، قيمة pH، وتركيز FMOCl. أظهرت النتائج أن الشروط المثلى هي: إضافة $200 \mu\text{L}$ من المحلول العياري (يحتوي على الغليفوزات و/أو AMPA)، و $200 \mu\text{L}$ من محلول رباعي بورات الصوديوم (1 mM ، 10.5 pH)، و $200 \mu\text{L}$ من محلول FMOCl ($8 \mu\text{M}$). ترك المزيج يتفاعل لمدة 45 min عند درجة حرارة الغرفة ($25 \pm 3^\circ \text{C}$).

ونظراً لاستخدام ثلاثة أحجام متساوية، يُؤخذ بالحسبان معامل تمديد قدره 3 عند حساب التراكيز النهائية.

4.2. الشروط الكروماتوغرافية المثلى

تم الفصل على عمود C18 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ، $5 \mu\text{m}$) بطور متحرك مكوّن من أسيتونتريل ومحلول خلاص الصوديوم (20 mM ، 5.2 pH) بنسبة $50:50$ (v/v). معدل التدفق 1.0 mL/min ، درجة حرارة العمود 40°C ، وحجم الحقن $20 \mu\text{L}$. تم الكشف الفلوري عند طول موجة إثارة 265 nm وطول موجة انبعاث 310 nm .

5. التحقق من صحة الطريقة Method Validation

تم التحقق من صحة الطريقة وفق إرشادات ICH Q2(R1) باستخدام محاليل عيارية نقية.

5.1. اختبار ملائمة النظام (SST)

اعتمد تقييم ملائمة النظام على تسع حقنات متتالية لمحلول عياري مشترك بتركيز $1 \mu\text{M}$ لكل من الغليفوزات و AMPA (وهي الحقنات نفسها المستخدمة في حساب التكرارية)، حيث حُسب زمن الاحتباس (Retention Time, tR)، عدد الطبقات النظرية (Number of Theoretical Plates, N)، معامل التذييل (Tailing Factor, T)، معامل الفصل (Resolution, Rs)، و $\text{RSD}\%$ للمساحة وزمن الاحتباس.

5.2. الانتقائية

فُيِّمَتْ بتحليل المحلول الشاهد blank (المُحضّر باستبدال 200 µL من المحلول العياري للغليفوزات و AMPA بـ 200 µL ماء مقطر، مع إضافة 200 µL من محلول منظم من رباعي بورات الصوديوم، و 200 µL من كاشف (FMOC-Cl)، المحاليل العيارية الفردية، والمحلول العياري المشترك، مع التأكد من عدم وجود تداخل عند أزمنة احتباس المشتقين وحساب Rs.

5.3. الخطية والمدى

أُعدت منحنيات معايرة لكل من الغليفوزات و AMPA بـ 11 نقطة تركيز (ثلاث مكررات لكل تركيز) ضمن المجال 0.88 – 98.62 ppb للغليفوزات و 0.58 – 64.78 ppb AMPA (بعد تصحيح عامل التمديد). رُسمت مساحة القمة مقابل التركيز وحُسب معامل الارتباط (r^2) بطريقة الانحدار الخطي.

5.4. الصحة (الاسترجاع)

فُيِّمَتْ عند ثلاثة مستويات تركيز (منخفض، متوسط، مرتفع) بثلاث مكررات مستقلة ضمن المجال الخطي المعتمد. حُسبت نسبة الاسترجاع وفق المعادلة:

$$\text{Recovery \%} = (\text{التركيز العملي المقاس} / \text{التركيز النظري المضاف}) \times 100$$

5.5. الدقة: تمّ تقييم الدقة بنوعيتها كما يلي:

- **التكرارية:** تحليل تسع مكررات مستقلة من المحلول العياري المشترك ضمن نفس اليوم وتحت نفس ظروف التشغيل. ونظراً لكون عملية الاشتقاق تتطلب زمناً ثابتاً للتفاعل (45 دقيقة)، فقد تم تحضير محلول اشتقاق جديد لكل مكرر بالشكل مستقل، لضمان ثبات زمن التفاعل لكل قياس وتقادي أي تأثير زمني على الاستجابة الفلورية.
- **الدقة المتوسطة:** تكرار التحليل خلال ثلاثة أيام مختلفة، باستخدام نفس النهج في تحضير محاليل الاشتقاق لضمان ثبات شروط التفاعل.

استُخدم محلول عياري مشترك بتركيز ابتدائي 1 µM (يعادل 56.36 ppb للغليفوزات و 37.01 ppb AMPA بعد التمديد).

5.6. حد الكشف (LOD) وحد التقدير الكمي (LOQ)

حُسبا وفق المعادلتين:

$$\text{LOD} = 3.3 \text{ SD} / a$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ SD} / a$$

حيث SD هو الانحراف المعياري للاستجابة، و a هو ميل منحنى المعايرة [30].

5.7. المتانة

فُيِّمَتْ متانة الطريقة من خلال إدخال تغييرات صغيرة ومقصودة في الظروف التحليلية، شملت:

- pH الطور المتحرك (± 0.2)
- درجة حرارة العمود ($\pm 5^\circ \text{C}$)
- معدل التدفق ($\pm 0.1 \text{ mL/min}$)
- تركيز الكاشف ($\pm 1 \mu\text{M}$)
- pH وسط الاشتقاق (± 0.1)
- وزمن الاشتقاق ($\pm 5 \text{ min}$)

أُجريت التجارب باستخدام محلول عياري مشترك بتركيز ابتدائي قدره 1 μM لكل من الغليفوزات و AMPA قبل الاشتقاق، وهو ما يقابل تركيزاً نهائياً مقداره 56.36 ppb للغليفوزات و 37.01 ppb لـ AMPA (بعد تصحيح عامل التمديد)، بثلاث مكررات لكل قياس وحُسبت قيم RSD% لمساحة القمم. اعتُبرت الطريقة متينة إذا بقيت $\%RSD < 5$.

6. تطبيق الطريقة المحسنة على عينات مائية بيئية

بعد التحقق من صحة الطريقة، تم تطبيقها على العينات البيئية الحقيقية لتقييم قابليتها للتطبيق العملي في الظروف الواقعية.

جُمعت ثلاث عينات مائية في عبوات غامقة ونظيفة وفق بروتوكولات جمع العينات المعتمدة لتحليل الملوثات العضوية. أُخذت عينة المياه السطحية بطريقة الغمر المباشر (Grab Sampling) من عمق 20 cm تقريباً تحت سطح الماء. جُمعت جميع العينات خلال يوم واحد من شهر تشرين الثاني من مواقع مختلفة في قرية بعمره ذات النشاط الزراعي، ريف مصياف، محافظة حماة، سوريا، وذلك وفق طبيعة استخدام المصدر المائي ودرجة تأثره بالنشاط الزراعي، وكانت كما يلي:

- العينة 1: نبع مياه شرب نقي (بعيد نسبياً عن النشاط الزراعي).
- العينة 2: نبع يُستخدم للري وأحياناً للشرب (قريب من مناطق زراعية).
- العينة 3: مياه سطحية من نهر يمر بمنطقة زراعية مكثفة.

نُقلت العينات في مبرد مع ثلج ($\leq 4^\circ\text{C}$) وتم حفظها في الظلام عند 4°C ، رُشحت عبر مرشحات ميكروية بقطر مسام 0.45 μm لإزالة المواد العالقة، ثم خضعت مباشرة لعملية الاشتقاق والتحليل باستخدام الطريقة المحسنة والمتحقق من صحتها خلال مدة لا تتجاوز 48 ساعة من جمعها. ويُعد تطبيق الاشتقاق المباشر متبوعاً بالتحليل الكروماتوغرافي دون خطوات استخلاص أو تركيز مسبق نهجاً موثقاً في عدد من الدراسات السابقة الخاصة بتحليل الغليفوزات و AMPA في العينات المائية باستخدام FMOC-Cl والكشف الفلوري [31-32].

النتائج والمناقشة

1- اختبار ملائمة النظام SST

بعد تثبيت الشروط المثلى التي تم التوصل إليها في مرحلة التحسين المنهجي، أظهر اختبار ملائمة النظام أداءً كروماتوغرافياً جيداً. كما هو موضح في الجدول (2)، تجاوز عدد الطبقات النظرية 4500 لمشتق الغليفوزات و 2895 لمشتق AMPA، وهي قيم تفوق الحد الأدنى المطلوب (< 2000). كما حقق معامل فصل $R_s = 1.629$ ، مما يضمن فصل جيد بين القمتين. بقيت قيم الانحراف المعياري النسبي ($\%RSD$) أقل من 0.2% لزمّن الاحتباس وأقل من 2% لمساحة القمة، وهذا يعكس استقراراً عالياً للنظام وصلاحيته للاستخدام الروتيني.

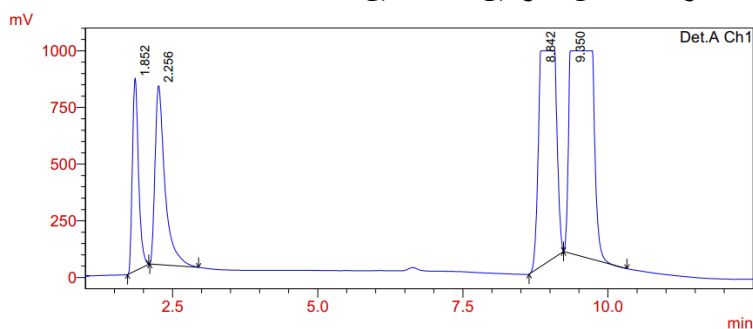
الجدول (2): معلمات اختبار ملائمة النظام (SST) للطريقة المحسنة وفق ICH Q2 R1

زمن الاحتباس (min) tR	عدد الطبقات النظرية N	معامل التذييل T	معامل الفصل Rs	RSD % لزمّن الاحتباس	RSD % لمساحة القمة
Gly 1.857	4501	1.441	-	0.059	1.779
AMPA 2.274	2895	1.878	1.629	0.121	1.962
حدود القبول (ICH)	< 2000	≥ 2.0	≤ 1.5	≥ 1.0	≥ 2.0

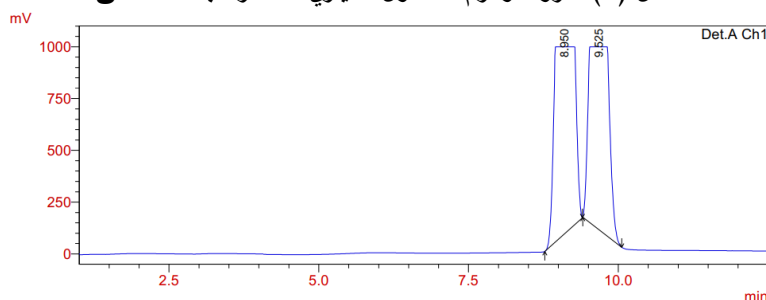
2- الانتقائية

أكدت نتائج اختبار الانتقائية قدرة الطريقة على التمييز بين مشتقي الغليفوزات و AMPA دون أي تداخل كروماتوغرافي. يظهر الشكل (2) كروماتوغرام المحلول العياري المشترك بعد الاشتقاق، حيث ظهر مشتق الغليفوزات عند زمن احتباس 1.857 دقيقة ومشتق AMPA عند 2.274 دقيقة، بينما ظهر الكاشف الزائد Fmoc-Cl وناتج تحلله (Fmoc-OH) عند زمني احتباس أطول (حوالي 8.8 و 9.3 دقيقة). حقق معامل الفصل بين القمتين $R_s = 1.629$ ، وهو ما يفوق الحد الأدنى المطلوب للفصل التحليلي المقبول ($R_s \geq 1.5$) ويضمن فصل جيد بين المشتقين [33-34].

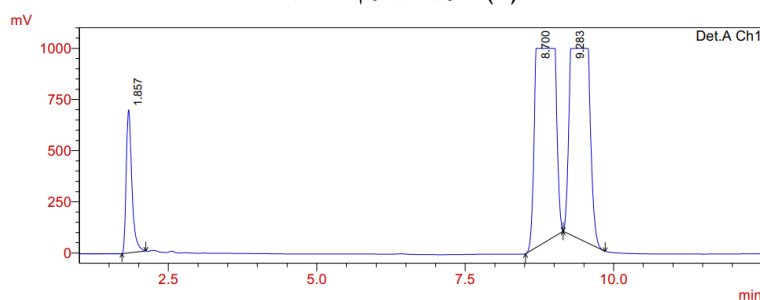
يوضح الشكل (3) كروماتوغرام المحلول الشاهد (blank)، والشكلان (4) و (5) كروماتوغرامات المشتقين الفرديين. لم تظهر أي قمم تداخلية عند أزمنة احتباس المركبين المستهدفين.



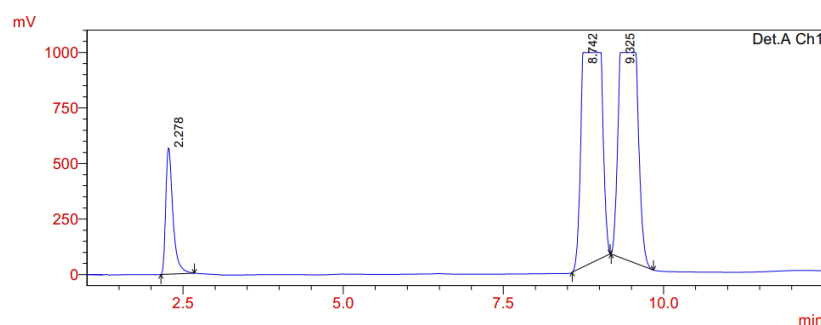
الشكل (2): كروماتوغرام المحلول العياري المشترك بعد الاشتقاق



الشكل (3): كروماتوغرام المحلول الشاهد



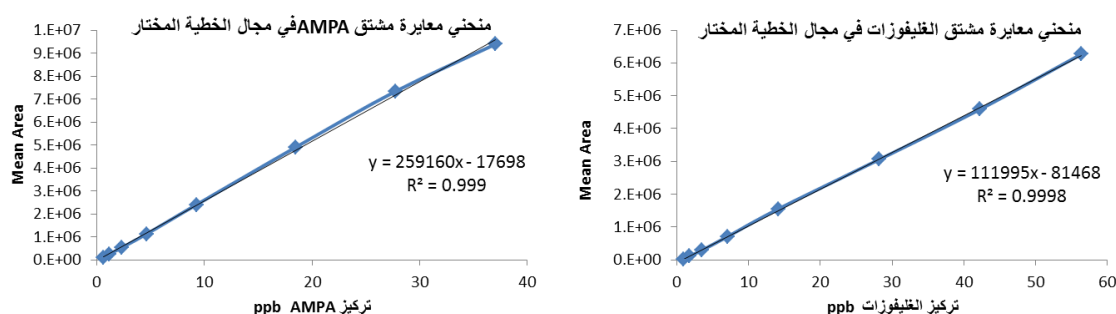
الشكل (4): كروماتوغرام مشتق الغليفوزات لوحده



الشكل (5): كروماتوغرام مشتق AMPA لوحده

3- الخطية والمدى

لوحظ عند التراكيز المرتفعة تشبع تدريجي في استجابة كاشف الفلورة، مما أدى إلى انحراف العلاقة عن السلوك الخطي ($r^2 = 0.9584$ للغليفوزات و 0.9487 لـ AMPA). ولذلك تم تحديد مجال خطية أكثر ملاءمة يضمن استجابة تحليلية خطية مستقرة. فتم اختيار مجال الخطية للغليفوزات من 0.88 إلى 56.36 ppb بمعامل ارتباط قدره 0.9998 ، في حين حدد مجال الخطية لـ AMPA من 0.58 إلى 37.01 ppb بمعامل ارتباط قدره 0.999 (الشكل 6). تلبي هذه القيم متطلبات ICH Q2 R1 ($r^2 \geq 0.99$) وتغطي التراكيز المتوقعة في معظم العينات البيئية.



الشكل (6): منحني المعايرة لمشتقي الغليفوزات و AMPA ضمن المجال الخطي المختار باستخدام HPLC-FLD

4- الصحة

أظهرت دراسات الاسترجاع صحة عالية للطريقة. حيث تراوحت نسب الاسترجاع بين 92.38% و 103.92% للغليفوزات، وبين 87.19% و 105.24% لـ AMPA. يبين الجدولان (3) و (4) تفاصيل نسب الاسترجاع. يقع متوسط الاسترجاع حوالي 99% للغليفوزات و 97% لـ AMPA ضمن النطاق المقبول وفق إرشادات ICH Q2(R1) لتحليل الآثار عند مستويات ppb، مما يؤكد صلاحية الطريقة للتقدير الكمي الدقيق، ويعكس فعالية الشروط المثلى للاشتقاق والفصل التي تم تطويرها في المرحلة الأولى.

الجدول (3): نسب الاسترجاع للغليفوزات عند كل مستوى تركيز (n = 3)

التركيز النظري (ppb)	مساحة القمة (y)	التركيز العملي (x) (ppb)	الاسترجاع % Recovery	R% ± SD متوسط
56.36	6,209,632	56.17	99.67	99.98 ± 2.241
56.36	6,379,093	57.69	102.36	
56.36	6,098,228	55.18	97.91	
28.18	3,058,901	28.04	99.51	98.60 ± 5.825
28.18	2,833,888	26.03	92.38	
28.18	3,198,193	29.28	103.92	
1.76	108,998	1.70	96.57	99.40 ± 3.385
1.76	112,807	1.73	98.50	
1.76	121,987	1.82	103.15	

معادلة منحني المعايرة للغليفوزات: $Y = 111995 X - 81468$

الجدول (4): نسب الاسترجاع لـ AMPA عند كل مستوى تركيز (n = 3)

التركيز النظري (ppb)	مساحة القمة Y	التركيز العملي X (ppb)	الاسترجاع % Recovery	R% ± SD متوسط
37.012	9,382,194	36.27	98.00	98.13 ± 1.739
37.012	9,567,761	36.99	99.93	
37.012	9,234,871	35.70	96.46	
18.506	4,887,193	18.93	102.27	103.13 ± 1.525
18.506	5,029,662	19.48	105.24	
18.506	4,987,228	19.31	104.35	
1.157	267,276	1.10	95.07	90.63 ± 4.032
1.157	250,987	1.04	89.64	
1.157	243,663	1.01	87.19	

معادلة منحني المعايرة لـ AMPA: $Y = 259160 X - 17698$

5- الدقة

يوضح الجدول (5) نتائج التكرارية لمشتقي الغليفوزات و AMPA. بينت النتائج تقارباً عالياً في قيم زمن الاحتباس ومساحة القمة لكلا المركبين، حيث كانت قيم الانحراف المعياري النسبي (RSD%) لزمن الاحتباس منخفضة جداً (أقل من 0.2 %)، مما يعكس استقراراً ممتازاً في أداء النظام الكروماتوغرافي. كما بلغت قيم RSD% لمساحة القمة أقل من 2 % لكل من الغليفوزات و AMPA، وهو ما يقع ضمن الحدود المقبولة وفق متطلبات ICH Q2(R1)، مما يؤكد تكرارية جيدة للطريقة التحليلية.

الجدول (5): نتائج التكرارية (Repeatability) لمشتقي الغليفوزات و AMPA

AMPA		Gly		المكرر
مساحة القمة	زمن الاحتباس	مساحة القمة	زمن الاحتباس	
9,382,194	2.259	6,209,632	1.852	1
9,267,761	2.257	6,379,093	1.854	2
9,234,871	2.256	6,098,228	1.851	3
9,054,589	2.254	6,131,509	1.852	4
9,387,151	2.256	6,271,228	1.852	5
9,229,572	2.254	6,308,080	1.854	6
9,011,503	2.252	6,112,222	1.852	7
8,908,951	2.250	6,092,620	1.851	8
8,961,870	2.253	6,075,892	1.852	9
9,159,829	2.255	6,186,500	1.852	المتوسط
179,746	0.0027	110,096	0.0011	SD
1.962	0.121	1.779	0.059	RSD%

كما يوضح الجدول (6) نتائج الدقة المتوسطة، والتي أجريت تحت ظروف تشغيل مختلفة شملت أياماً متعددة. أظهرت النتائج تقارباً جيداً في القيم المقاسة لكل من زمن الاحتباس ومساحة القمة رغم التغيرات التشغيلية. وقد بلغت قيم RSD% لزمن الاحتباس أقل من 1% لكلا المركبين، مما يدل على استقرار زمن الاحتباس تحت ظروف تحليلية متغيرة. في حين بقيت قيم RSD% لمساحة القمة ضمن الحدود المقبولة، حيث لم تتجاوز 5% لكل من الغليفوزات و AMPA، مما يعكس دقة متوسطة جيدة للطريقة التحليلية.

الجدول (6): نتائج الدقة المتوسطة (Intermediate Precision) لمشتقي الغليفوزات و AMPA

AMPA		Gly		المكرر
مساحة القمة	زمن الاحتباس	مساحة القمة	زمن الاحتباس	
9,047,213	2.258	6,547,631	1.842	1
8,664,235	2.259	6,438,289	1.845	2
8,642,369	2.268	5,817,323	1.852	3
9,054,589	2.254	6,131,509	1.852	4
9,387,151	2.256	6,271,228	1.852	5
9,229,572	2.254	6,308,080	1.854	6
8,635,508	2.233	5,975,568	1.839	7
8,657,520	2.260	5,952,914	1.850	8
8,557,710	2.276	5,982,345	1.857	9
8,875,096	2.258	6,158,321	1.849	المتوسط
306,960	0.011663	247,153	0.0059	SD
3.46	0.516625	4.0133	0.32	RSD%

تشير هذه النتائج مجتمعة إلى أن الطريقة المقترحة تتمتع بدقة عالية وتكرارية جيدة واستقرار مناسب تجاه التغيرات التشغيلية.

6- حد الكشف LOD وحد التقدير الكمي LOQ

أظهرت الطريقة حساسية تحليلية عالية تمثلت في انخفاض قيم LOD و LOQ، حيث بلغ LOD و LOQ للغليفوزات 3.9 ppt و 12 ppt على التوالي، في حين سُجلت لمركب AMPA قيم أقل بلغت 1.7 ppt و 0.012 ppt على التوالي، ويوضح الجدول (7) قيم LOD و LOQ المحسوبة لكلا المركبين.

الجدول (7): قيم LOD و LOQ للغليفوزات و AMPA

LOQ		LOD		a	SD	ارتفاع التشويش	
ppt	ppb	ppt	ppb				
12	0.012	3.9	0.0039	111995	131	852- 878 - 1103 - 759 - 941 - 942 - 829 - 1151	Gly
5	0.005	1.7	0.0017	259160	131	852- 878 - 1103 - 759 - 941 - 942 - 829 - 1151	AMPA

ويُعزى التفوق الواضح في حساسية الكشف لمركب AMPA مقارنة بالغليفوزات إلى الارتفاع الملحوظ في ميل منحنى المعايرة ($a = 259160$ مقابل 111995)، رغم ثبات قيمة الانحراف المعياري لضجيج الخلفية ($SD = 131$) في كلا الحالتين، مما يدل على استجابة فلورية أقوى لمركب AMPA بعد الاشتقاق. وقد تم اعتماد نفس قيم ضجيج الخلفية لكلا المركبين، حيث تم قياسها من خط الأساس ضمن المجال الزمني القريب من أزمنة الاحتباس (1.8-2.2) min، مع ملاحظة استقرار الإشارة وعدم وجود تغير ملحوظ في مستوى الضجيج ضمن هذه المنطقة. وتجدر الإشارة إلى أن قيم LOD و LOQ المحسوبة في هذه الدراسة تعكس الحساسية التحليلية للطريقة الكاملة تحت ظروف المحاليل القياسية المستخدمة في التحقق من الصحة، والتي تضمنت جميع خطوات الاشتقاق والتحليل

الكروماتوغرافي للمحاليل القياسية. وقد تختلف حدود الكشف العملية عند تطبيق الطريقة على مصفوفات بيئية أكثر تعقيداً نتيجة تأثيرات المصفوفة وارتفاع ضجيج الخلفية واحتمال وجود مركبات متداخلة تؤثر في الاستجابة التحليلية. وتتفوق حساسية الطريقة المقترحة بشكل واضح على دراسات سابقة مثل Vlassa ppb (LOD 0.28 و LOQ 0.35) و Garba ppb (LOD 4 و LOQ 8) [26، 18]، مما يدل على الحساسية العالية للطريقة المقترحة وإمكانية استخدامها في رصد التراكيز المنخفضة من الغليفوزات و AMPA في العينات المائية.

7- المتانة

يوضح الجدول (8) نتائج تقييم متانة الطريقة التحليلية المحسّنة. أبدت الطريقة استقراراً جيداً تجاه التغيرات الطفيفة في درجة حرارة العمود، ومعدل التدفق، وزمن الاشتقاق إذ بقيت قيم الانحراف المعياري النسبي (%RSD) ضمن الحدود المقبولة (< 5%). في المقابل، أظهرت الطريقة حساسية واضحة للتغيرات في قيمة pH الطور المتحرك (0.2 ±)، حيث تجاوزت قيم %RSD الحد المستهدف، مما يشير إلى التأثير الحرج لهذا العامل على الأداء التحليلي. يمكن تفسير هذه الحساسية بكون قيمة pH = 5.2 تقع بالقرب من قيم pK_{a3} للغليفوزات (5.3 [35]، 5.6 [17]، 6 [36] و pK_{a2} AMPA 5.4 [17])، مما يجعل أي تغير طفيف في درجة الحموضة مؤثراً بالشكل مباشر على حالة التأين للمركبين، وينعكس ذلك على سلوك احتجازهما الكروماتوغرافي وشدة الاستجابة الفلورية. لذلك، يُعد الضبط الدقيق لقيمة pH عاملاً أساسياً لضمان ثبات الطريقة التحليلية ودقة نتائجها أثناء التطبيق الروتيني.

الجدول (8): تقييم متانة الطريقة التحليلية (n = 3)

الشرط الأصلي	التغير المطبق	RSD% المساحة القمية	RSD% المساحة القمية
		AMPA	Gly
pH الطور المتحرك	5.2	5.1	5.3
		5.4	5.6
درجة حرارة العمود	40	3.8	3.2
°C		4.1	3.5
معدل التدفق	1.0	3.4	2.9
(mL/min)		3.7	3.1
تركيز الكاشف	8.0	2.4	3.8
µM		3.8	2.7
زمن الاشتقاق (min)	45	4.2	3.6
		4.5	3.9

وفي سياق تقييم الأداء التحليلي بشكل أشمل، يوضح الجدول (9) مقارنة بين الطريقة الحالية وعدد من الدراسات السابقة التي اعتمدت اشتقاق FMOC-Cl مع الكشف الفلوري. وتُظهر هذه المقارنة أن الطريقة المطوّرة تحقق حدود كشف (LOD) وحدود تقدير كمي (LOQ) منخفضة بالشكل ملحوظ مقارنة بمعظم الدراسات المرجعية، مما يعكس تحسناً واضحاً في حساسية الطريقة.

كما أظهرت الطريقة الحالية معاملات ارتباط خطي مرتفعة ($r^2 \geq 0.999$)، إلى جانب نسب استرجاع تقع ضمن المجال المقبول، وقيم دقة منخفضة (%RSD < 5%)، مما يدل على موثوقية الأداء التحليلي. إضافةً إلى ذلك، تم تحقيق فصل كروماتوغرافي كافٍ ($R_s = 1.629$) باستخدام طور متحرك متساوي بسيط، وهو ما يمثل ميزة عملية من حيث تقليل زمن التحليل وتبسيط التشغيل مقارنة بالطرائق التي تعتمد على التدرج.

الجدول (9): مقارنة أداء الطريقة الحالية مع بعض الدراسات المنشورة

باستخدام HPLC-FLD بعد اشتقاق Fmoc-CI

RSD % Precision	Recovery % Accuracy	LOQ (ppb)	LOD (ppb)	r ²	مجال الخطية ppb		
<17%	NR	0.04	0.025	0.995	0.05 – 1	Gly	[23]
<9%	NR	0.08	0.05	0.993	NR	AMPA	
2-7	82-104	0.84	0.28	0.99976	0.195-25	Gly	[26]
2-7	82-104	1.05	0.35	0.99945	0.195-25	AMPA	
4	NR	0.25	NR	NR	0.25-100	Gly	[27]
4	NR	1	NR	NR	1-100	AMPA	
<18%	91 – 113	0.8	0.2	NR	NR	Gly	[28]
<18%	91 – 113	0.8	0.2	NR	NR	AMPA	
-	86 – 104	1	NR	NR	1 – 20	Gly	[29]
-	86 – 104	1	NR	NR	1 – 20	AMPA	
≤5	92 –104	0.012	0.0035	0.9998	0.88-56.36	Gly	هذه الدراسة
≤5	89 –105	0.005	0.0015	0.999	0.58-37.01	AMPA	

جميع القيم معبر عنها بوحدة (µg/L) ppb، و NR (Not Reported) تشير إلى بيانات غير مذكورة في الدراسة.

8- تطبيق الطريقة المحسنة على عينات مائية بيئية

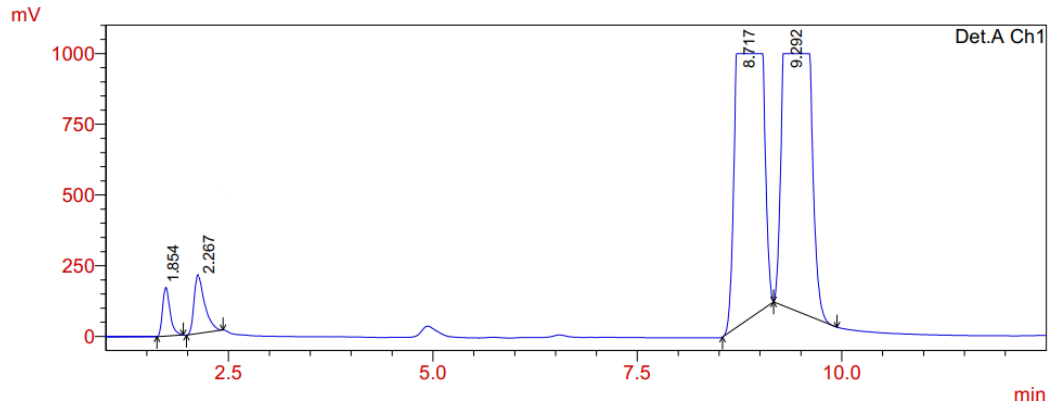
أظهرت نتائج تحليل ثلاث عينات مائية بيئية تبايناً واضحاً في وجود الآثار المتبقية للغليفوزات و AMPA تبعاً لطبيعة الموقع. فقد تبين أن العينتين؛ الأولى (نوع مياه شرب بعيد عن النشاط الزراعي) والثانية (نوع قريب نسبياً من مناطق زراعية) كانتا خاليتين من كلا المركبين، إذ كانت التراكيز أقل من حد الكشف (LOD). في المقابل، أظهرت العينة الثالثة (مياه سطحية من نهر في منطقة زراعية مكثفة) وجود تلوث بكلا المركبين، حيث بلغت تراكيز الغليفوزات و AMPA (38.15 و 26.60) ppb على التوالي.

تم حساب التراكيز باستخدام معادلة الخطية للغليفوزات ($y = 111995x - 81468$) و AMPA ($y = 259160x - 17698$)، مع الأخذ بعين الاعتبار عامل التمديد ($DF = 3$) الناتج عن تحضير العينة (خلط 200 µL من العينة مع 400 µL من المحلول المنظم البوراتي وكاشف Fmoc-CI)، يوضح الجدول (10) قيم مساحة القمم والتراكيز المقاسة والحقيقية بعد تصحيح عامل التمديد.

الجدول (10): نتائج تحليل العينة البيئية الثالثة

المركب	مساحة القمة (y)	التركيز المقاس (ppb)	التركيز الحقيقي (ppb) = التركيز المقاس × 3
Gly	1,342,606	12.72	38.15
AMPA	2,279,869	8.87	26.60

ويُظهر الشكل (7) الكروماتوغرام الناتج عن تحليل العينة الثالثة، حيث تظهر قممًا للغليفوزات و AMPA عند أزمنة احتباس مميزة مع فصل جيد ودون تداخل ملحوظ.



الشكل (7): كروماتوغرام العينة الثالثة (مياه نهر زراعي) يظهر قمتي الغليفوزات و AMPA

تعكس نتائج هذه الدراسة وجود تباين في تراكيز الغليفوزات و AMPA في الأوساط المائية مقارنة بما ورد في الأدبيات السابقة. فقد أظهرت دراسة Pires ورفاقه في البرازيل تسجيل تراكيز للغليفوزات تراوحت بين 1.5 – 9.7 ppb ، و AMPA بين 0.6 – 1.93 ppb في المياه السطحية [37]. كما بيّنت دراسة Olivo في البرازيل أيضاً وجود الغليفوزات في المياه الجوفية بتراكيز وصلت إلى 6.80 ppb [38]. وفي الأرجنتين، أظهرت دراسة Demonte وجود الغليفوزات في 15 % من العينات بتراكيز تصل إلى 11.3 ppb ، و AMPA في 53 % من العينات بتراكيز بلغت 6.5 ppb [39]. أما في فرنسا فقد سجلت دراسة Arraj تراكيز للغليفوزات بحدود 1.7 ppb في المياه السطحية المرتبطة بالصرف الزراعي [17].

بالمقارنة مع هذه الدراسات، تُظهر نتائج هذه الدراسة تراكيز أعلى نسبياً في المياه السطحية (38.15 ppb للغليفوزات و 26.60 ppb لـ AMPA)، وهو ما قد يُعزى إلى اختلاف شدة الاستخدام الزراعي، والظروف البيئية المحلية، وخصائص مصادر المياه، ولا سيما تأثير الجريان السطحي المباشر في المناطق الزراعية المكثفة. وفي المقابل، أظهرت نتائج هذه الدراسة خلو عينات مياه الشرب من كلا المركبين (أقل من LOD)، مما يشير إلى محدودية انتقال هذه الملوثات إلى مصادر المياه المخصصة للاستهلاك البشري ضمن منطقة الدراسة.

وتجدر الإشارة إلى أن الحدود التنظيمية الدولية، مثل تلك المعتمدة من قبل EPA و EU وُضعت أساساً لمياه الشرب، وبالتالي فإن الاستناد إليها في هذا السياق يُستخدم كمؤشر على المخاطر المحتملة في حال انتقال هذه المركبات إلى مصادر مياه الشرب، وليس كتقييم مباشر لجودة المياه السطحية. وبناءً على ذلك، تؤكد النتائج الحالية أهمية المراقبة المستمرة للمياه السطحية في المناطق الزراعية، نظراً لدورها المحتمل كمصدر غير مباشر لتلوث المياه الجوفية ومياه الشرب.

الاستنتاجات والتوصيات:

أظهرت الدراسة الحالية النتائج التالية:

1. نجح التحقق الكامل من صحة الطريقة التحليلية المُحسَّنة للتقدير المتزامن عالي الحساسية للغليفوزات و AMPA باستخدام HPLC-FLD بعد الاشتقاق بكاشف FMOC-Cl، وفق إرشادات ICH Q2(R1).
2. حققت الطريقة انتقائية عالية مع فصل جيد بين المشتقين ($R_s = 1.629$)، وخطية ممتازة ($r^2 \geq 0.999$) ضمن مجال مناسب للتراكيز البيئية (56.36–0.88 ppb للغليفوزات و 37.01–0.58 ppb لـ AMPA).

3. أظهرت الطريقة استرجاعاً مرتفعاً % (92.38 – 103.92) للغليفوزات و % (87.19 – 105.24) AMPA ودقة جيدة ($RSD < 2\%$ للتكرارية و $< 5\%$ للدقة المتوسطة).
 4. تميزت الطريقة بحساسية استثنائية، حيث بلغ حد الكشف 3.9 ppt للغليفوزات و 1.7 ppt AMPA، مما يجعلها من أكثر الطرائق حساسية بين طرق HPLC–FLD المعتمدة على اشتقاق FMO–CI.
 5. أبدت الطريقة متانة مرضية تجاه معظم التغيرات التشغيلية، مع حساسية واضحة لتغيرات pH الطور المتحرك.
 6. نجحت الطريقة عند تطبيقها على عينات مياه بيئية حقيقية في الكشف عن الغليفوزات و AMPA بتركيز 38.15 ppb و 26.60 ppb على التوالي في مياه سطحية متأثرة بالنشاط الزراعي، بينما كانت العينات الجوفية خالية منهما.
 7. تُعد الطريقة المُطورة والمتحقق من صحتها أداة تحليلية موثوقة، حساسة، واقتصادية نسبياً، مناسبة للاستخدام في التحاليل الروتينية وبرامج الرصد البيئي لمتبقيات المبيدات في سوريا.
- واستناداً إلى نتائج الدراسة، يُوصى بتبني الطريقة التحليلية المُحسَّنة والمتحقق من صحتها كطريقة مرجعية لتقدير الغليفوزات و AMPA في عينات المياه البيئية ومياه الشرب ضمن المختبرات المحلية، مع توسيع نطاق تطبيقها ليشمل مصفوفات أخرى مثل التربة والمحاصيل الزراعية بعد إجراء دراسات تحقق إضافية خاصة بكل مصفوفة. كما توصي الدراسة بإجراء دراسات إضافية لتقييم تأثير المصفوفة وإجراء تجارب الاسترجاع ضمن المصفوفة في البيئات المختلفة، بما يتيح توسيع نطاق تطبيق الطريقة على مصفوفات أكثر تعقيداً. كما يُوصى بالتحكم الدقيق في قيمة pH الطور المتحرك عند 5.2 أثناء التطبيق الروتيني، وإجراء اختبارات دورية لملاءمة النظام نظراً لحساسية الطريقة لهذا العامل. كذلك، يُقترح إجراء دراسات ميدانية واسعة النطاق باستخدام هذه الطريقة لتقييم مستويات التلوث بالغليفوزات و AMPA في مختلف المناطق الزراعية والمائية في سوريا، بهدف إنشاء قاعدة بيانات وطنية تدعم برامج المراقبة البيئية وإدارة المخاطر المرتبطة باستخدام المبيدات.

References:

- [1] W. Li, K. Wang, P. Wang, P. Yang, S. Xu, J. Tong, Y. Zhang, Y. Yang, L. Han, M. Ye, S. Shen, B. Lei, and B. Liu, "Impact of glyphosate on soil bacterial communities and degradation mechanisms in large-leaf tea plantations," **Journal of Hazardous Materials**, vol. 483, p. 136626, 2025.
- [2] A. Grandcoin, S. Piel, and E. Baurès, "Aminomethylphosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate," **Water Research**, vol. 117, pp. 187–197, 2017.
- [3] W. A. Battaglin, M. T. Meyer, K. M. Kuivila, and J. E. Dietze, "Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation," **Journal of the American Water Resources Association**, vol. 50, no. 2, pp. 275–290, 2014.
- [4] I. Md. Meftaul, K. Venkateswarlu, R. Dharmarajan, P. Annamalai, M. Asaduzzaman, A. Parven, and M. Meghraj, "Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: Is it to be banned in modern agriculture?," **Environmental Pollution**, vol. 263, p. 114372, 2020.
- [5] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), **Toxicological Profile for Glyphosate**. U.S. Department of Health and Human Services, 2020.
- [6] O. K. Borggaard and A. L. Gimsing, "Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review," **Pest Management Science**, vol. 64, no. 4, pp. 441–456, 2008.

- [7] R. I. Bonansea, I. Filippi, D. A. Wunderlin, D. J. G. Marino, and M. V. Amé, "The fate of glyphosate and AMPA in a freshwater endorheic basin: An ecotoxicological risk assessment," **Water**, vol. 9, no. 12, p. 950, 2017.
- [8] J. L. Vicini, P. K. Jensen, B. M. Young, and J. T. Swarthout, "Residues of glyphosate in food and dietary exposure," **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 20, pp. 5226–5257, 2021.
- [9] B. S. Ojelade, O. S. Durowoju, P. O. Adesoye, S. W. Gibb, and G. I. Ekosse, "Review of glyphosate-based herbicide and aminomethylphosphonic acid (AMPA): Environmental and health impacts," **Applied Sciences**, vol. 12, no. 17, p. 8789, 2022.
- [10] S. Wang, B. Liu, D. Yuan, and J. Ma, "A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection," **Journal of Chromatography A**, vol. 1449, pp. 62–68, 2016.
- [11] J. P. K. Gill, N. Sethi, A. Mohan, S. Datta, and M. Girdhar, "Glyphosate toxicity for animals," **Environmental Chemistry Letters**, vol. 16, pp. 401–426, 2018.
- [12] C. Peillex and M. Pelletier, "The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity," **Journal of Immunotoxicology**, vol. 17, pp. 163–174, 2020.
- [13] S. Singh, V. Kumar, J. P. K. Gill, S. Datta, S. Singh, V. Dhaka, D. Kapoor, A. B. Wani, D. S. Dhanjal, M. Kumar, S. L. Harikumar, and J. Singh, "Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation," **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 17, p. 7519, 2020.
- [14] D. Oares, L. Silva, S. Duarte, A. Pena, and A. Pereira, "Glyphosate use, toxicity and occurrence in food," **Foods**, vol. 10, p. 2785, 2021.
- [15] R. Lacroix and D. M. Kurrasch, "Glyphosate toxicity: In vivo, in vitro, and epidemiological evidence," **Toxicological Sciences**, vol. 192, pp. 131–140, 2023.
- [16] IARC Working Group, **IARC Monographs, Volume 112: Some Organophosphate Insecticides and Herbicides**. Lyon, France, 2015.
- [17] . Arraj, "Conception d'un système d'élimination du glyphosate des eaux de drainage agricole," Ph.D. dissertation, Université de Lorraine, Lorraine, France, 2015.
- [18] J. Garba, A. W. Samsuri, R. Othman, and M. S. A. 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.
- [19] Agricultural Media Center, **Pesticide Guide in Syria**. Damascus, Syria, 2016, in Arabic.
- [20] D. P. Oulkar, S. Hingmire, A. Goon, M. Jadhav, B. Ugare, A. S. Thekkumpurath, and K. Banerjee, "Optimization and Validation of a Residue Analysis Method for Glyphosate, Glufosinate, and Their Metabolites in Plant Matrixes by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry," **Journal of AOAC International**, vol. 100, pp. 631–639, 2017.
- [21] P. J. Martin, K. He, L. Blaney, and S. R. Hobbs, "Advanced Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Method for Quantifying Glyphosate, Glufosinate, and Aminomethylphosphonic Acid Using Pre-Column Derivatization," **ACS EST Water**, vol. 3, no. 8, pp. 2407–2414, 2023.
- [22] M. E. Báez, E. Fuentes, M. J. Espina, and J. Espinoza, "Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: A critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies," **Journal of Separation Science**, vol. 37, no. 23, pp. 3408–3416, 2014.

- [23] B. Le Bot, K. Colliaux, D. Pelle, C. Briens, R. Seux, and M. Clément, "Optimization and Performance Evaluation of the Analysis of Glyphosate and AMPA in Water by HPLC with Fluorescence Detection," **Chromatographia**, vol. 56, pp. 161–164, 2002.
- [24] L. Carretta, R. Masin, and G. Zanin, "Review of studies analysing glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) occurrence in groundwater," **Environmental Reviews**, vol. 30, no. 1, pp. 88–109, 2022.
- [25] L. Sun, D. Kong, W. Gu, X. Guo, W. Tao, and Z. Shan, "Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography," **Journal of Chromatography A**, vol. 1502, pp. 8–13, 2017.
- [26] V. Pănescu, C. Herghelegiu, and S. Beldean-Galea, "Glyphosate and aminomethylphosphonic acid levels in water and soil samples from Transylvanian Roma community analyzed by HPLC-FLD method," **Studia UBB Chemia**, vol. 67, no. 4, pp. 273–285, 2022.
- [27] L. Alonso, M. Pérez, and R. García, "Optimization of FMOC-Cl derivatization for glyphosate and AMPA determination by HPLC-FLD," **Analytical Methods**, vol. 14, no. 6, pp. 789–798, 2022.
- [28] R. P. Gabardo, G. A. Cordeiro, and P. Peralta-Zamora, "LC-FLD determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in surface water from the Paraná River Basin," **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 32, no. 5, pp. 1037–1045, 2021.
- [29] J. K. Guerra, "Development and validation of a HPLC-FLD method for the quantification of glyphosate and AMPA in drinking water," Master's thesis, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal, 2022.
- [30] International Conference on Harmonisation (ICH), **Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)**. Geneva, Switzerland, 2005.
- [31] C. Hidalgo, C. Ríos, M. Hidalgo, V. Salvadó, J. V. Sancho, and F. Hernández, "Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters," **Journal of Chromatography A**, vol. 1035, no. 1, pp. 153–157, 2004.
- [32] E. Alexa, M. Häfner, M. Negrea, and A. Lazureanu, "HPLC and GC Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Water Samples," in *Proceedings of the 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, pp. 100–105, 2008.
- [33] The United States Pharmacopeia. General Chapter (621) Chromatography. In: USP-NF. Rockville, MD, USA; 2023.
- [34] D. Song and J. Wang, "Modified resolution factor for asymmetrical peaks in chromatographic separation," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 32, no. 5, pp. 1105–1112, 2003.
- [35] Z. Chen, W. He, M. Beer, M. Megharaj, and R. Naidu, "Speciation of glyphosate, phosphate and aminomethylphosphonic acid in soil extracts by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction system," *Talanta*, vol. 81, no. 1–2, pp. 298–304, 2010.
- [36] A. J. Al Rajab, "Impact sur l'environnement d'un herbicide non sélectif, le glyphosate: Approche modélisée en conditions contrôlées et naturelles," Ph.D. dissertation, École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 2007.
- [37] N. L. Pires, C. J. S. Passos, M. G. A. Morgado, D. C. Mello, C. M. C. Infante, and E. D. Caldas, "Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection in waters of the Santarém Plateau,

Brazilian Amazon," **Journal of Environmental Science and Health Part B**, vol. 55, pp. 794–802, 2020.

[38] V. E. Olivo, A. Tansini, F. Carasek, D. Cordenuzzi, S. Fernandes, M. A. Fiori, A. Fragoso, and J. Dal Magro, "Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization," **Ambiente e Agua**, vol. 10, pp. 286–294, 2015.

[39] L. D. Demonte, N. Michlig, M. Gaggiotti, C. G. Adam, H. R. Beldoménico, and M. R. Repetti, "Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method," **Science of the Total Environment**, vol. 645, pp. 34–43, 2018.

