

# קפיצת מדרגה

מאת ד"ר שולמית לוין\*

**הטכנולוגיה הכרומטוגרפית החדשה, ה-UPLC-Liquid Performance Ultra Chromatography, מציגה אפשרויות חדשות להעלות שוב במידה ניכרת את רף הביצועים הכרומטוגרפיים. אופק חדש נפתח לקבלת אינפורמציה מדעית חדשה ביתר מהירות ורגישות**

כלומר, עם כל עשור שעבר התקבלו פיקים חדשים יותר בכרומטוגרמות טיפוסיות. בסופו של דבר, בשנות האלפיים, כאשר ירד קוטר החלקיקים הכרומטוגרפיים עד מתחת ל-2.5 mm, גברה יעילות ההפרדה בצורה בולטת ואף יותר מכך, היא לא הושפעה באופן משמעותי מהעלאת המהירות הליניארית (או קצב הזרימה) של הפאזה הנעה, כפי שהיה טיפוסי בחומרי מילוי ישנים יותר.

את קיבולת הפיקים Peak Capacity, שהוא מספר הפיקים הפוטנציאליים הניתנים להפרדה בתחום זמן ההפרדה, ונהוג לסמנו כ-P. כרומטוגרפיה כזאת ניתנת לכינוי: Ultra Performance Liquid Chromatography או UPLC. בשימוש ב-UPLC ניתן כיום לנצל היטב את עקרונות הכרומטוגרפיה ולקבל הפרדות בעזרת קולונות קצרות בעבודה בקצבי זרימה מהירים יחסית, ולקבל זמני הרצה

## עקרון העבודה - תיאוריה

כרומטוגרפיה נוזלית מסוג High Performance Liquid Chromatography (HPLC) הוכיחה עצמה כטכניקה מובילה במעבדות מחקר ותעשייה אנליטיות ברחבי העולם במשך 30 השנים האחרונות. אחד הגורמים שדחפו קדימה את התפתחות הטכניקה היו הפיתוחים המתמידים של חומרי המילוי עבור הקולונות הכרומטוגרפיות, ששימשו להפרדות (1). העקרונות המנחים של הפיתוחים האלה התבססו על כך שיעילות ההפרדה, שנמדדת בעזרת מספר הפלטות התיאורטיות (Theoretical Plates - N), גדלה ככל שקטן קוטר החלקיקים. נהוג להשוות את יעילות ההפרדה של קולונות שונות בגיאומטריה שלהן בעזרת גובה אקוויולנטי לפלטה תיאורטית, Height Equivalent to Theoretical Plate (HETP), שנמדד למעשה בצורה הבאה:

$$HETP = \frac{L}{N} \quad 1.$$

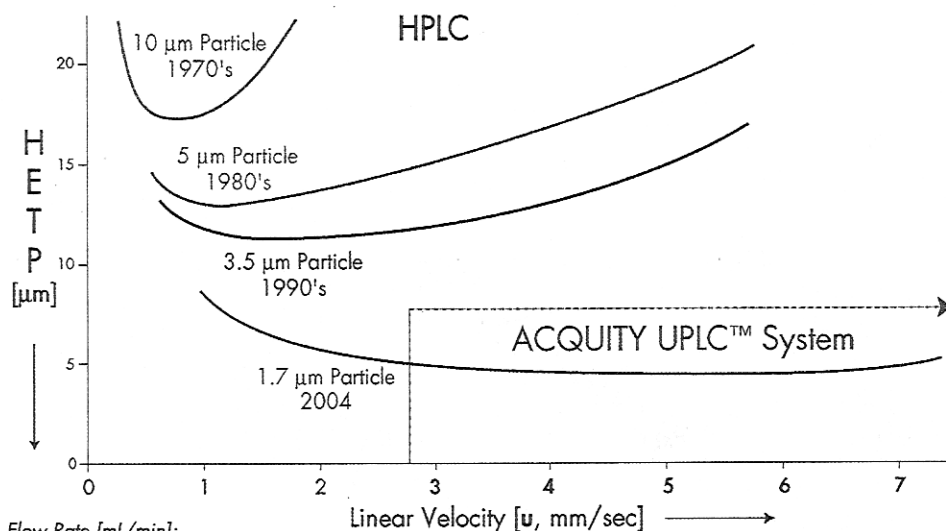
שבה L הוא אורך הקולונה ו-N הוא מספר הפלטות התיאורטיות. ככל שערכו של H נמוך יותר כך גדלה יעילות ההפרדה ומתקבלים פיקים חדים יותר. התנהגות H כפונקציה של קוטר החלקיקים של חומר המילוי בקולונה הכרומטוגרפית מתוארת על ידי משוואת Van-Deemter, שנלמדת בכל שיעור למתחילים בכרומטוגרפיה, כפי שניתן לראות במשוואה הבאה:

$$HETP = a(dp) + \frac{b}{u} + C(dp)^2 u \quad 2.$$

משוואה זו היא אמפירית, ומתארת את הקשר בין HETP, הגובה האקוויולנטי לפלטה תיאורטית, לבין המהירות הליניארית u (שהיא פרופורציונלית לקצב הזרימה) וקוטר החלקיקים dp. ניתן לראות, שככל שקוטר החלקיקים קטן יותר כך גם קטן הגודל HETP, כלומר יעילות ההפרדה טובה יותר. מסיבה זאת משמשת העקומה המתארת את משוואה זו ככלי עבודה לבדיקת כושר הביצוע של קולונות כרומטוגרפיות במשך שנים.

תמונה 1 מראה, שמדי עשור ירד קוטר חלקיקי המילוי בקולונות, ותוך כדי כך ירדו ערכי HETP.

\*המחלקה האנליטית, מדטכניקה (נציגת חברת Waters בישראל).



Flow Rate [mL/min]:	ID = 1.0 mm	ID = 2.1 mm	ID = 4.6 mm
0.04	0.07	0.10	0.13
0.15	0.3	0.45	0.6
0.7	1.4	2.1	2.8
	0.17	0.75	3.5
	0.20	0.9	4.2
	0.24	1.05	4.9

תמונה 1: סדרת עקומות Van-Deemter שמראות את המגמה של התפתחות גודל החלקיקים בחומרי המילוי הכרומטוגרפיים במשך 30 השנים האחרונות.

קצרים מאוד, בעוד כושר ההפרדה והרגישות אינם נפגעים, כפי שניתן לראות בתמונה 2. בתמונה זו ניתן לראות, שזמן ההרצה בקולונה הקצרה הארוזה ב-1.7 mm פחת משלושים דקות לארבע דקות (!), בעוד הרזולוציה הכרומטוגרפית נשארה דומה מאוד.

העקומה התחתונה בתמונה 1 מייצגת חלקיקים מתחת ל-2 מיקרון, והיא מראה, שניתן להעלות את קצבי הזרימה בתחום רחב יחסית ללא איבוד היעילות של ההפרדה. המיקום הנמוך שלה בסקלת ה-HETP מעיד כך שיש לקולונות הארוזות בהם פוטנציאל לקבל פיקים חדים מאוד, ובכך להעלות

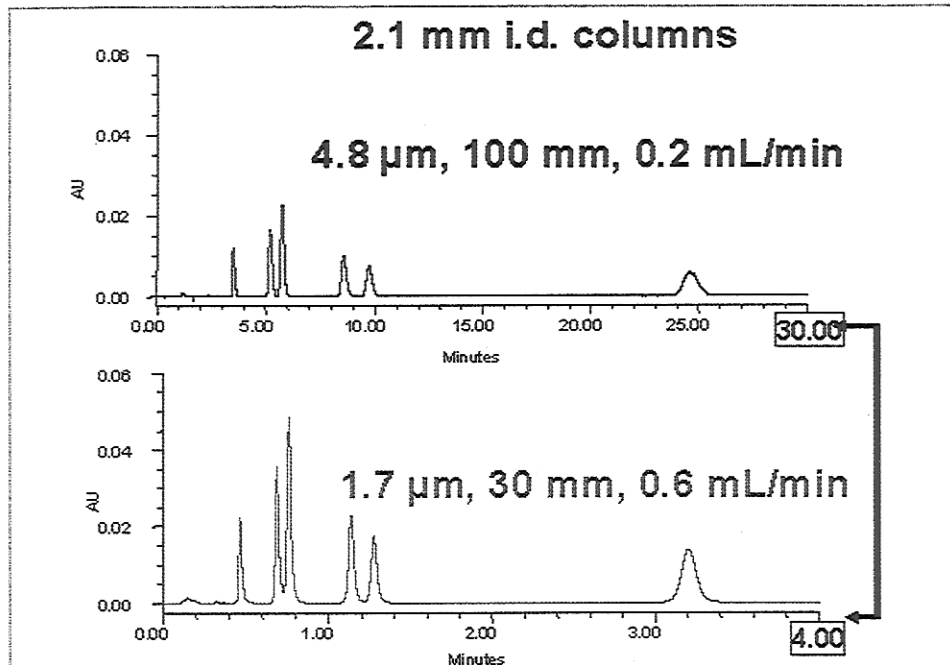
גישה אחרת לניצול האפשרות לעבודה ב-UPLC היא דווקא ניצול של יכולת ההפרדה המדהימה של הקולונות הארוכות יותר (10 ס"מ) הארוחות בחלקיקים בקוטר של 1.7 mm עבור דוגמאות מורכבות במיוחד, בלא לתת את הדעת לקיצור זמן ההרצה. במקרה כזה, תחול עליה משמעותית בכומר ההפרדה, ואז עולה מאוד מספר הפיקים הניתנים לאנליזה ולזיהוי בתוך יער הפיקים, יחסית למקובל היום בקולונות כרומטוגרפיות טיפוסיות ב-HPLC. תמונה 3 מדגימה מקרה כזה בו השימוש בקולונה ארוכה יחסית (10 ס"מ), הארוכה בחלקיקים של 1.7 mm, מאפשר קבלת כושר ביצוע טוב בהרבה מהמקובל ב-HPLC כיום, אפילו במערכות המתקדמות ביותר. הכרומטוגרמה המתקבלת ממכשיר ה-UPLC מדגימה את השיפור המשמעותי שניתן לקבל במספר הפיקים הפוטנציאליים לזמן הרצה (קיבולת הפיקים, המסומנת ב-P בכרומטוגרמה). בעקבות שיפור זה היה ניתן לראות, שבדוגמה היו בעצם עוד רכיבים רבים מאוד, שלא היה ניתן לראות אותם מופרדים ב-HPLC הקונוונציונלי.

## העקרונות המנחים של הפיתוחים האלה התבססו על כך שיעילות ההפרדה, שנמדדת בעזרת מספר הפלטות התיאורטיות, גדלה ככל שקטן קוטר החלקיקים

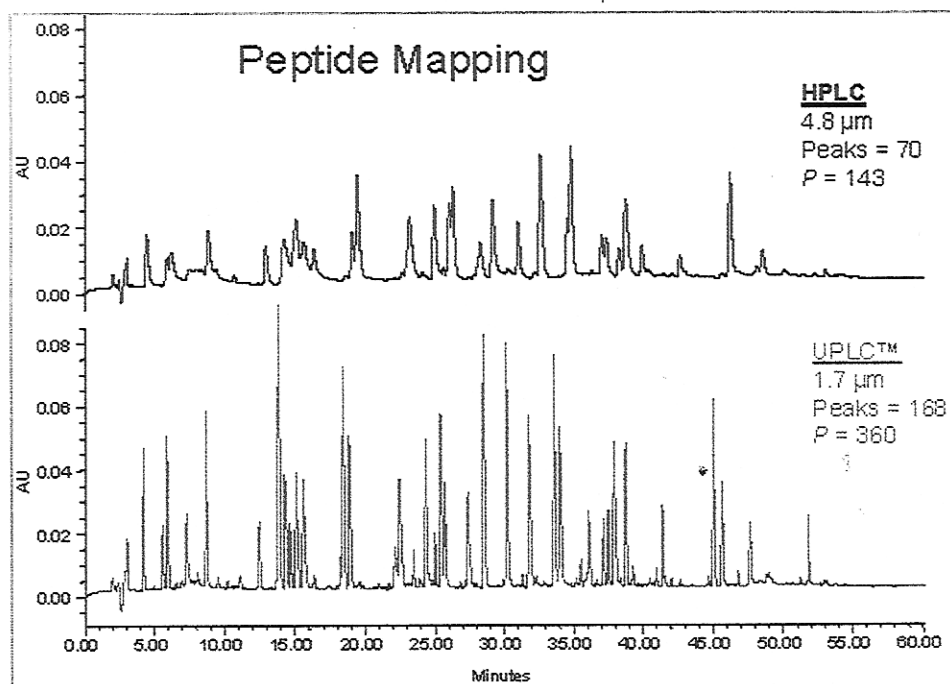
### הכימיה של חלקיקים כרומטוגרפיים קטנים

יצירת חלקיקים כרומטוגרפיים בקוטר של תת-2mm היא אתגר משמעותי ביותר, וחוקרים ניסו לפתח כיוון זה (2, 3). חלקיקים של 1.5 mm מוצעים כיום באופן מסחרי, אך הם אינם נקבוביים, ושטח הפנים שלהם נמוך מאוד יחסית, דבר שגורם לזמני השהייה קצרים וליעילות הפרדה ירודה יחסית לגודל החלקיקים לו היו נקבוביים. כמו כן, ניתן למצוא באופן מסחרי קולונות באורך של 2-5 ס"מ ארוחות בחלקיקים של 1.8 mm - 2.5 mm נקבוביים, אך שימושן מוגבל בשל מגבלת הלחץ הקיימת כיום במערכות HPLC, עד 400-500 אטמוספרות, ויכולתן לעמוד בלחצים של 1000 אטמוספרות לא נבחנה. כמו כן, המצע של חלק מהחלקיקים הללו מבוסס על סיליקה-ג'ל שהיא מוגבלת בתחום ה-pH 2-9 ועלולה לגרום לעיוות צורת פיקים של חומרים מכילי קבוצות אמיניות. באחרונה פותחה פאזה נחה המבוססת על פחמימן C18, הקשור למצע של קו-פולימר שהוא "הכלאה" בין סיליקה אי-אורגנית עם סיליקה אורגנית (4) (hybride).

המשך בעמ' 16



תמונה 2: שתי כרומטוגרמות שהתקבלו בקולונות בקוטר 2.1 mm אחת באורך של 10 ס"מ ארוכה בחלקיקים של 4.8 mm וקצב הזרימה היה 0.2 mL/min, ואילו השנייה באורך של 3 ס"מ ארוכה בחלקיקים של 1.7 mm וקצב הזרימה היה 0.6 mL/min.



תמונה 3: שתי כרומטוגרמות שנלקחו ממכשיר HPLC ומכשיר UPLC באותה תוכנית גרדיינט של הפאזה הנעה, ובאותה מהירות ליניארית. מספר הפיקים שהתקבל מול קיבולת הפיקים מובאים על הכרומטוגרמות.

#### Chromatographic Conditions

Columns: ACQUITY UPLCTM C18 2.1 x 100 mm, 1.7 μm

Bridged Hybrid C18 2.1 x 100 mm, 4.8 μm

Mobile Phase A: 0.02% TFA in H<sub>2</sub>O

Mobile Phase B: 0.016% TFA in ACN

Flow Rate: 0.1 mL/min

Gradient	Time (min)	Profile A%	Profile B%
	0.0	95	5
	60.0	55	45

Injection Volume: 10.0 μL

Sample: MassPREPTM Enolase Digestion Standard

Sample Diluent: 0.02% TFA in water

Sample Concentration: 100 pmol

Temperature: 38 °C

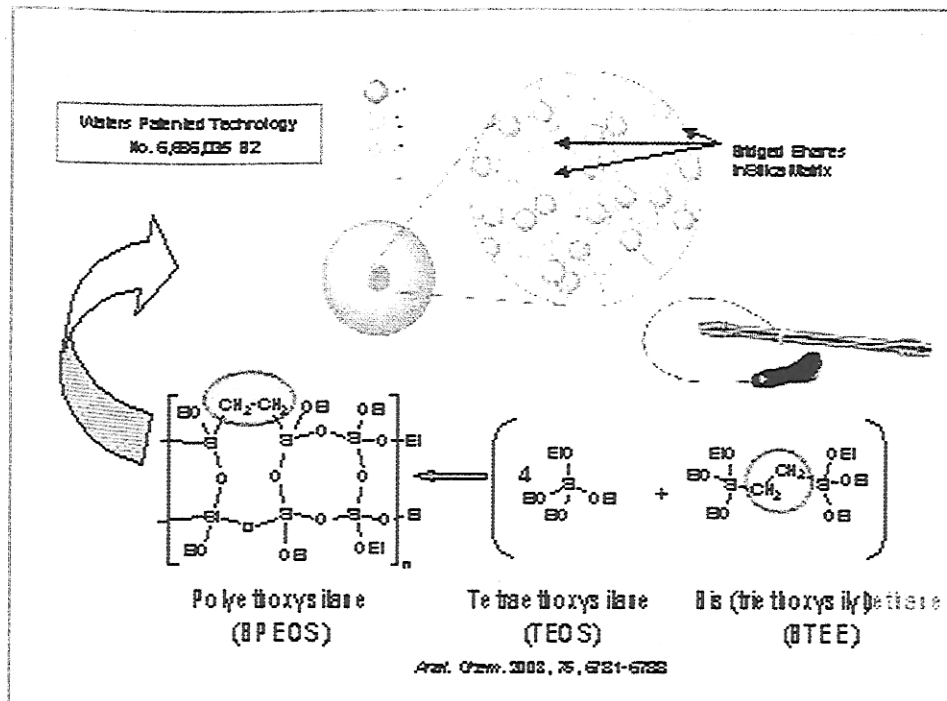
Detection: UV @ 214 nm

Sampling rate: 20 pts/sec

Time Constant: 0.1

Instrument: Waters ACQUITY UPLCTM, with 250 nL

Capcell TUV detector



תמונה 4: הכימיה של הסינתזה של חלקיקי עמודות Acquity™, הקולונה של מכשיר ה-UPLC

מצע זה עמיד בתחום pH רחב, והוא בעל יציבות מכנית וכימית גבוהה, בעזרת גישור כימי בשלד של הפולימר של קבוצות ethane, כפי שמתואר בתמונה 4. הפאזה הנחה המבוססת על מצע זה נקראת "Acquity™ (4)", והיא מיוצרת גם בקוטר חלקיקים של 1.7mm, בפיזור קוטר חלקיקים צר.

הבעיה עם קוטר חלקיקים קטן עד כדי כך היא שיש צורך במסנן (frit) מיוחד בראש הקולונה, כדי שיחזיק חלקיקים כל כך קטנים מחד גיסא, ושלא ייסתם מהר מאידך גיסא. כמו כן, טכנולוגיית האריזה חייבת להיות מתקדמת מאוד, כדי לא לאבד את כושר הביצוע של הקולונות הקצרות והדקות. ושלא יהיו שינויים בין אצווה לאצווה של הקולונות. שטח הפנים הפנימי של הצינור הגלילי שמרכיב את הקולונה חייב להיות מלוטש, וגם הצנרת המובילה אליה וממנה נדרשת להיות מלוטשת, במיוחד בדפנותיה הפנימיות. כמו כן דרוש היה שגם החיבורים יהיו מלוטשים במיוחד, ויעמדו בלחץ הגבוה ולא יגרמו להרחבה מיותרת של פיקים מחוץ לקולונה הכרומטוגרפית (Extra-column band broadening). עם זאת, נדרשת קלות הפעלה על ידי המשתמש והגיל והיבור של הקולונה אל המכשיר כמו בכל HPLC רגיל, כפי שניתן לראות בתמונה 5.

## שינויים טכנולוגיים הדרושים לניצול מרבי של קולונות UPLC

כדי שיהיה ניתן לנצל עד למקסימום את הרזולוציה והרגישות המתוגברות, שניתן לקבל מהשימוש בקולונות ארוזות בחלקיקים תת-2mm, היה צורך

**הכרומטוגרמה המתקבלת  
ממכשיר ה-UPLC מדגימה את  
השיפור המשמעותי שניתן לקבל  
במספר הפיקים הפוטנציאליים  
לזמן הרצה**

לבצע שינויים מרחיקי לכת בטכנולוגיה הקיימת של מכשירי ה-HPLC על כל חלקיהם, בנוסף לאלה שצוינו לעיל בדיון על הקולונות. היה צורך בתכנון מחדש של המערכת הכרומטוגרפית, כדי שכל חלקיה יתאימו לצורת העבודה השונה הזאת, ולא רק שיפורים קלים במנגנונים הקיימים; כלומר, היה דרוש פתרון הוליסטי. לדוגמה, היה צורך במשאבה שעמידה עד לכ- 1000 אטמוספרות לחץ או 15,000 psi, ושעדיין תאפשר ערבוב ממסים באותה רמת דיוק, שהמשתמשים רגילים לוב-HPLC אם בעבודה



תמונה 5: חיבור קולונות Acquity™ למכשיר UPLC, מבוצע באופן רגיל למדי ללא הידוק מיוחד, במרחק מינימאלי בין מערכת ההזרקה לבין תא הגלאי.

של רכיבים, שלא ניתן להבחין בהם בטכנולוגיות הקיימות כיום בדוגמה כה מורכבת.

בתמונות 7 א' ו-ב' ניתן לראות כיצד נוספה אינפורמציה רבה בכרומטוגרפיה שנקלחה במכשיר ה-UPLC לעומת מכשיר ה-HPLC, דבר שמאפשר גילוי רכיבים חדשים וזיהויים מעבר למקובל כיום בטכנולוגיות הקיימות.

## סיכום

בימינו הגיעו המדענים לסף יכולות ההפרדה בשיטת ה-HPLC הקונונציונלי, גם במכשירים המתקדמים ביותר שבהם. הופעת הטכנולוגיה הכרומטוגרפית החדשה, ה-UPLC, מציגה אפשרויות חדשות להרחיב את היריעה ולהעלות שוב את רף הביצועים הכרומטוגרפיים בקפיצת מדרגה. אופק חדש נפתח לקבלת אינפורמציה מדעית חדשה שלא ניתן היה לקבלה על ידי הטכנולוגיה הקונונציונלית, בצורה מהירה יותר ורגישה יותר.

## ספרות מקצועית

1. HPLC Columns, Theory, Technology and Practice. Uwe Neue, Wiley-VCH 1997.
2. Jerkovitch AD, Mellors JS, and Jorgenson JW. LCGC North America, 2003; 21: 7
3. Wu N, Lippert JA, and Lee ML. J. Chromatogr. 2001; 911: 1
4. Wyndham KD, O'Gara JE, et al. Anal. Chem. 2003; 75: 6781-6788
5. Application Notes at [www.waters.com](http://www.waters.com) (search by Library No.)

Simultaneous Quantification of Chemically Diverse Compounds Using ESCI™ Multi-Mode Ionization on a Waters ACQUITY UPLC™-Quattro Premier™

Author: Kate Yu1, Peter Alden1, Li Di2, Susan Q. Li2, Ed Kerns2, Source: Waters Applications Note / Year: 2005 / Volume: / Page: 4 pp. Library No.: 720001097EN

HT Quantitative Analysis for A Drug Mixture by LC/MS/MS: UPLC™/MS/MS and HPLC/MS/MS Compared. Author: Kate Yu, David Little, Rob Plumb, Source: Waters Applications Note / Year: 2005 / Volume: February / Page: 4 pp. Library No.: 720001120EN

Linearity of an ACQUITY UPLC™/Quattro Premier™ System for the Analysis of 17-Hydroxyprogesterone in Protein-Precipitated Plasma, Author: Tabisam Khan and Lisa J Calton, Source: Waters Applications Note / Year: 2005 / Volume: / Page: 3 pp. Library No.: 720001135EN

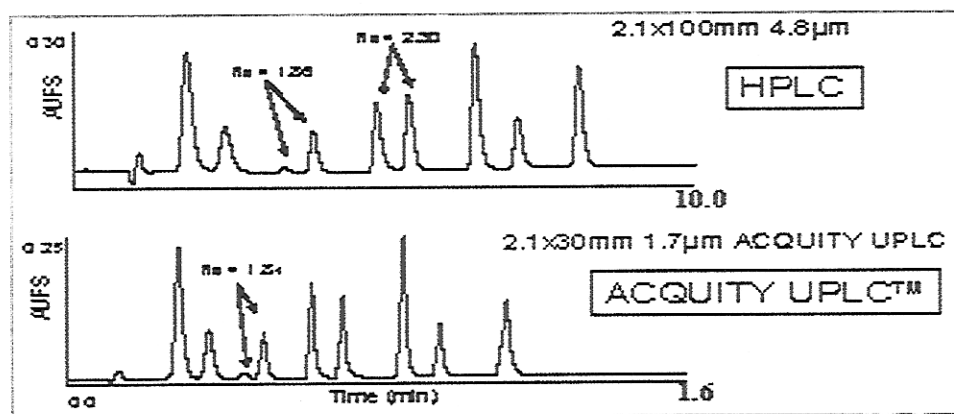
המשך בעמ' 20

## דוגמאות ליישומים

### קיצור זמנים ללא איבוד רזולוציה כרומטוגרפית

אחת הפשרות המקובלות בכרומטוגרפיה היא ויתור על רמת הרזולוציה לשם השגת מהירות הפרדה גדולה. השימוש בקולונות ב-UPLC מאפשר קיצור זמנים משמעותי בלי שתיפגם הרזולוציה, כמו שניתן לראות בתמונה 6. בתמונה זו ניתן לראות כרומטוגרמה של תרופות משתנות (דיורטיות - diuretics), המתקבלת במכשיר טיפוס של HPLC בזמן הזרקה של 10 דקות, ולעומתה הרצה ב-UPLC באורך זמן של 1.6 דקות. כאן ניתן לראות, כיצד הרזולוציה כמעט שלא נפגמה מהעלייה בקצב הזרימה, כפי שחזתה עקומת Van-Deemter של הקולונה הזאת (תמונה 1, עקומה תחתונה). זאת בשל העובדה, שגם בהעלאת קצב הזרימה, כלומר מהירות הליניארית, הגובה האקוויולנטי לפלטה תיאורטית HETP נשאר כמעט קבוע.

### דוגמאות מורכבות - תוספת אינפורמציה חדשה לזרימה קיימת



תמונה 6. הדגמה של האפשרות לקיצור זמנים משמעותי ב-UPLC לעומת HPLC של תערובת תרופות דיורטיות ללא איבוד משמעותי של רמת הרזולוציה.

השימוש במס-ספקטרומטר כגלאי מתאים לדוגמאות מורכבות ובעלות מספר רב של תרכובות בלתי ידועות. כאשר החלק הכרומטוגרפי של המכשיר מגביר את הרגישות ואת יעילות ההפרדה, ומתקבלים פיקים חדים בהרבה, הוא מעצים את כושר הביצוע הכללי של מערכת הכרומטוגרפיה-נזלית מס-ספקטרומטרית: Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry (LC-MS), בתנאי שגלאי המס-ספקטרומטריה מצליח להתמודד עם זרימת הנתונים המהירה מאוד מהמערכת הכרומטוגרפית. בדוגמה שמובאת בתמונות 7א' ו-7ב' (בעמוד הבא) ניתן לראות אנליזה של תמצית מצמח הפסיפלורה, שהיא דוגמה רבת רכיבים. במקרה זה, גלאי המס-ספקטרומטריה הוא אכן בעל אלקטרוניקה מהירה מאוד ומסוגל לעקוב אחר הפיקים החדים מאוד שמגיעים אליו ממכשיר ה-UPLC. לכן התוצאה הכוללת מרשימה ביותר מבחינת יכולת ההבחנה

בגרדיינט (הרכב פאזה נעה משתנה עם הזמן) ואם בעבודה איזוקרטיט (הרכב פאזה נעה קבוע). שינויים טכנולוגיים רבים היו נחוצים במערכת הזרקת הדוגמאות. לשם הכנסת הדוגמה למערכת היה צורך במערכת הזרקה שתאפשר הכנסה מדויקת של נפחים קטנים יותר מהמקובל ב-HPLC כזה שמתאים לשימוש בקולונות בנפח פנימי כל כך קטן (כ-120 עד 250 מיקרוליטר נפח פנימי) תוך עמידה בלחצים גבוהים כל כך. כמו כן מערכת ההזרקה אמורה להכניס דוגמאות אל הקולונה בצורה חלקה ככל האפשר, על מנת למנוע הפרשי-לחץ כאלה שיזיקו לראש הקולונה הכרומטוגרפית. שיפור נוסף חשוב הוא היכולת לקחת דוגמה מהמיכל שלה והזרקתה בצורה מהירה מאוד, כדי לנצל כראוי את הזמנים הקצרים שמאפשרת העבודה ב-UPLC. בנוסף לכל אלה, תוספת הרגישות שמאפשר המכשיר חייבה תוספת של מנגנונים מיוחדים למניעת carry-over (שאריית מהזרקה להזרקה). גם הגלאי של המערכת נדרש לשינוי דיקלי. רוחבי הפיקים שמתקבלים במכשיר ה-UPLC הם בתחום

של שניות בודדות, לכן נוצר הצורך לתכנן מחדש את הגלאי הן מבחינת נפח תא הזרימה שבו, הן מבחינת המרכב האופטי שלו, והן מבחינת האלקטרוניקה המהירה הנדרשת לגילוי פיקים כה חדים. בראש ובראשונה, קצב הדגימה של הגלאי חייב להיות מהיר דיו כדי לקלוט מספיק נקודות נתונים על פני הפיק כדי לקבל שטח אמין והדיר. כמו כן, תא הזרימה בגלאי חייב לצמצם למינימום את הרחבת פיק, כלומר להיות בעל נפח מינימלי, כדי לשמר את יעילות ההפרדה המדהימה שמתקבלת מהקולונה. בד בבד עליו לשמר את אורכה של הדרך האופטית, כדי לא לאבד את הרגישות הפוטנציאלית. בדרך כלל, רגישות הגלאי עולה פי 2 עד 3 מהמקביל הקיים לו ב-HPLC. כאשר הגלאי הוא מס-ספקטרומטר, רגישות הגילוי עולה במיוחד, הרחבת הפיקים על ידיו היא מינימלית, וקצבי הזרימה המקובלים ב-UPLC מתאימים לו ללא פיצול הזרימה.

based Bioanalytical Assays Using UPLC™, Author: Nicholas Ellor, Frances Gorycki, Chung-Ping Yu, Source: Waters Applications Note / Year: 2005 / Volume: February / Page: 2 pp. Library No.: 720001122EN

A New Paradigm for Metabolism Studies: UPLC/Q-ToF, Author: Jose Castro-Perez, Robert Plumb, Jennifer Granger, Waters Corporation, Source: Waters Applications Note / Year: 2004 / Volume: / Page: 6pp. Library No.: 720000953EN

UPLC-*oa*TOF MS with One-Minute Separation Times Applied to a Metabonomics 90-Day Tox Study, Author: Jennifer H. Granger and Robert S. Plumb, Waters Corporation; John N. Haselden, Maria L. Beaumont and Mark Hodson, GlaxoSmithKline, Source: Waters Applications Note / Year: 2004 / Volume: / Page: 5 pp. Library No.: 720001054EN

Non-Mammalian Metabonomics: An Analysis of Coffee Bean Extracts, Author: Jennifer H. Granger, Robert S. Plumb, and James N. Willis, Waters Corporation, Source: Waters Applications Note / Year: 2004 / Volume: / Page: 3 pp. Library No.: 720001058EN

Metabonomics Analysis of Zucker Rat Urine using UPLC/MS(TOF): A Time-Course Study, Author: Prof. Ian D. Wilson, Rebecca Williams, AstraZeneca; Jennifer H. Granger and Robert S. Plumb, Waters Corporation, Source: Waters Applications Note / Year: 2004 / Volume: / Page: 4 pp. Library No.: 720001057EN

Application of Ultra Performance Liquid Chromatography for LC/MS-Based Metabonomics, Author: Prof. Ian Wilson, AstraZeneca; Jennifer Granger, Robert Plumb, Waters, Source: / Year: 2004 / Volume: / Page: Library No.: 720000866EN

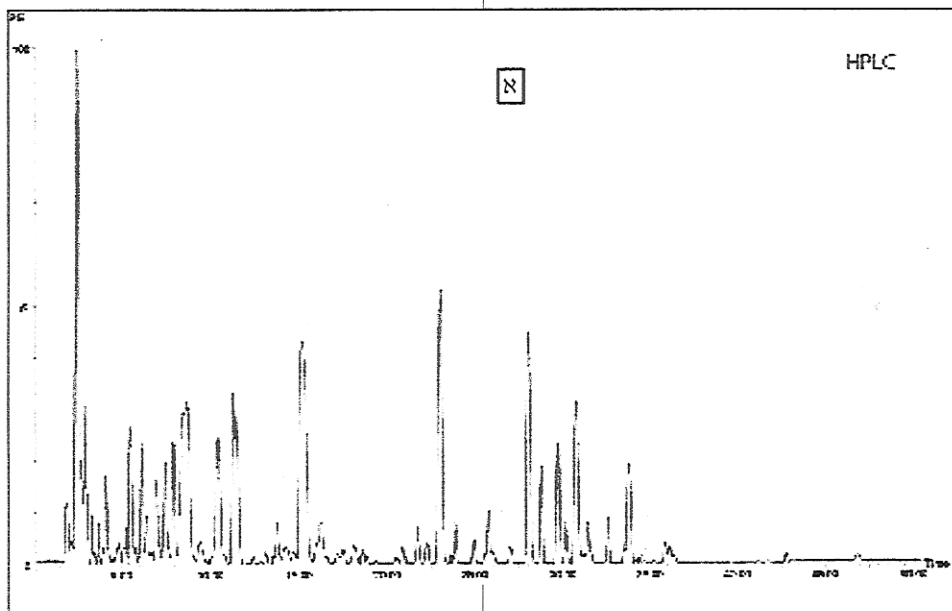
The Metabolism of Acetaminophen: Harnessing the Power of UPLC/MS: Jennifer H. Granger and Robert S. Plumb, Waters Corporation, Source: Waters Applications Note / Year: 2004 / Volume: / Page: 2 pp. Library No.: 720001059EN

ACQUITY UPLC for the Rapid Analysis of Soft Drinks, Author: Andrew Aubin, Waters Corporation, Year: 2004 / Volume: / Page: 4 pp. Library No.: 720001053EN

Maximizing Chromatographic Resolution of Metabolites Using UPLC, Author: Jose Castro-Perez, Robert Plumb, Jennifer Granger, Source: LC/GC North America Applications Notebook / Year: 2004 / Volume: September / Page: 1 Library No.: 720001016EN

Comparison of the Resolution and Sensitivity of UPLC and Monolithic Columns for Metabolite Profiling, Author: Robert S. Plumb, Jose Castro-Perez, Kelly A. Johnson, and Michael D. Jones, Waters Corporation, Source: Waters Applications Note / Year: 2004 / Volume: / Page: 2 pp. Library No.: 720001064EN

תמונה 7: כרומוטוגרמה שמתקבלת מאנליזה של תמיצת פסיפלורה: תמונה א' נלקחה במכשיר HPLC ואילו תמונה ב' נלקחה ממכשיר UPLC.



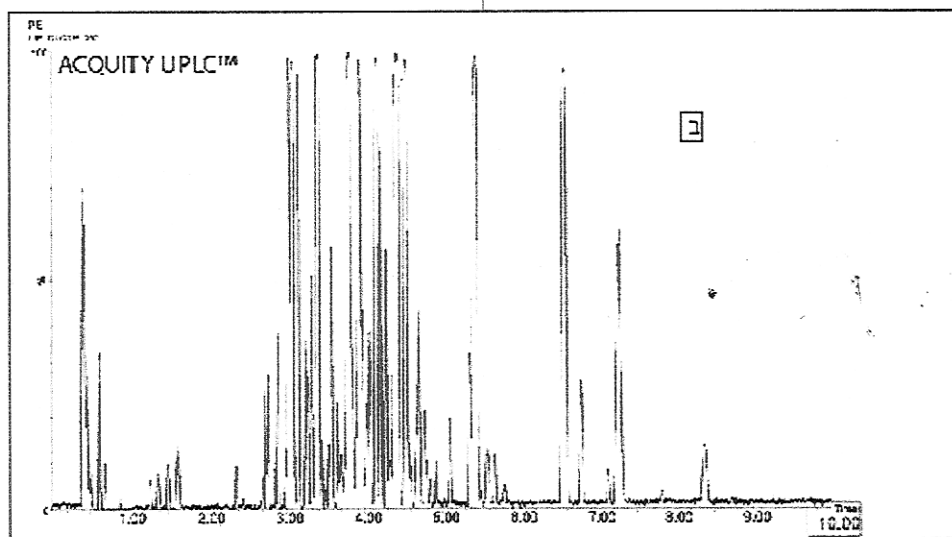
HPLC conditions:

HPLC System: Waters® Alliance® HT 2795

Column: Waters Symmetry® C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 mm particle size) with guard column (20 mm x 3.9 mm, 5 mm particle size).

Mobile phase: MeCN (B) : H<sub>2</sub>O (0.2% HCOOH) (A) • Gradient: 0-10 min: 15% B; 10-40 min: 15-30% B; 40-50 min: 30-15% B

Column temperature: 35°C; Flow: 1 mL/min - split 1:4



UPLC conditions:

System: Waters ACQUITY UPLC™

Column: Waters ACQUITY UPLC™ BEH C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.7 mm particle size)

Mobile phase: MeCN (B) : H<sub>2</sub>O (0.2% HCOOH) (A)

Gradient: 0-1 min: 5% B; 1-10 min: 20% B; 10-13 min: 20% B; 13-14 min: 30% B; 14-19 min: 30% B; 19.1-27 min 5% B

Column temperature: 40°C; Flow: 0.6 mL/min

Mass Spectrometry conditions:

MS= LCT Premier™ *oa*-TOF

Capillary Voltage: 3000 V (+VE) and 2600 V (-VE)

Ionisation mode: Positive and Negative electrospray

Resolution: 5500 FWHM (V mode) and 12000 FWHM (W mode)

Reference Lock mass: Leucine Enkephalin [M+H]<sup>+</sup>= 556.2771

Leucine Enkephalin [M-H]<sup>-</sup>= 554.2615

LockSpray switch time: 10 spectra HPLC

30 spectra ACQUITY UPLC™

Acquisition time: 1 spectra/second HPLC

1 spectra/ 0.2 seconds ACQUITY UPLC™