

The Intrada Amino Acid is a separation column for non-labeled amino acids and related compounds using LC-MS systems.

The column provides LC-MS analysis for intact amino acids and related compounds. Various column dimensions may be selected in order to optimize analyses across different combinations of amino acids.

### Product Specification

Product Name	Intrada Amino Acid
Base Materials	Pure spherical silica
Particle Size	3µm
Ligand	Special phase for amino acid

## HPLC column usage and directions

**The Intrada Amino Acid column should be used only for LC-MS. Analytical sensitivity depends on the specific LC-MS instrumentation. Please see the reverse side of this instruction manual for details on analytical conditions and warnings.**

### Column usage

Dropping, shaking, striking, or any other extreme actions with this column may lead to decreased column performance and efficiency. Please do not tighten or loosen the column end-fitting as this can lead to fluid leakage and abnormal column pressure.

### Column connection and release

There is a "FLOW" mark on the column label. Please connect the column according to the directional flow of the elution. When using a wrench to connect or release the column, please place the wrench near the end fitting closest to the line. Please do not place the wrench on the column body itself as this can lead to problems including, but not limited to, eluent leakage.

### Mobile phase and sample filtration

Please filter the mobile phase and sample solution through either a 0.45µm or 0.2µm membrane filter prior to injection. If there is any floating or deposited material, it can cause higher pressure via column clogging. In particular, please be careful of microbial pollutants in the aqueous mobile phase.

### Column enclosed solvent

The column's enclosed solvent is **92%acetonitrile, 8%water**. It can be directly substituted with the initial mobile phase of the amino acid analysis.

### Mobile phase preparation

This column requires gradient elution with two kinds of mobile phases. To retain ionic amino acids, pH modifiers like formic acid, ammonium formate, or ammonium acetate are required. Organic solvents can be used such as acetonitrile, methanol, tetrahydrofuran (THF), etc., with concentration of 0-100%.

### Flow rate

In general, please set the flow to levels similar to conventional 3µm columns. In order to achieve best results, please optimize flow rate around the desired separation characteristics, solvent consumption, column pressure and temperature.

### RECOMMENDED FLOW RATE (depends on column length and conditions)

Column I.D.	1mm	2mm	3mm
Recommended Flowrate (mL/min)	0.03-0.2	0.1-0.6	0.2-1.0

### Pressure

Peak pressure is approximately 50MPa.

### Temperature

Column temperature range is suitable for 15-65 degrees Celsius. Please adjust the temperature according to the desired peak shape, retention and separation characteristics. However, please note that extended exposure to high temperature and high pH can decrease column lifetime.

### pH

The typical pH usage range is 1.5-8. However, if the column is used extensively on the alkali side, column lifetime can differ depending upon analytical conditions such as organic solvent density, pH adjusting agent composition, temperature, and eluent structure. Please adjust the pH according to your own personal objectives.

If storing the column after use under alkali conditions, please store the column after replacing the preservation solution. Please note that extensive exposure to alkali conditions can shorten column lifetime.

### Cleaning the column

100mM ammonium formate is a general column washing solvent. Wash column with 100mM ammonium formate for one hour, then wash with water for 30 minutes, followed by initial gradient mobile phase for conditioning. Polymers like protein may cause coagulation in the column and be difficult to wash out, so this column cleaning procedure is strongly recommended pre-treatment.

### Column preservation solution

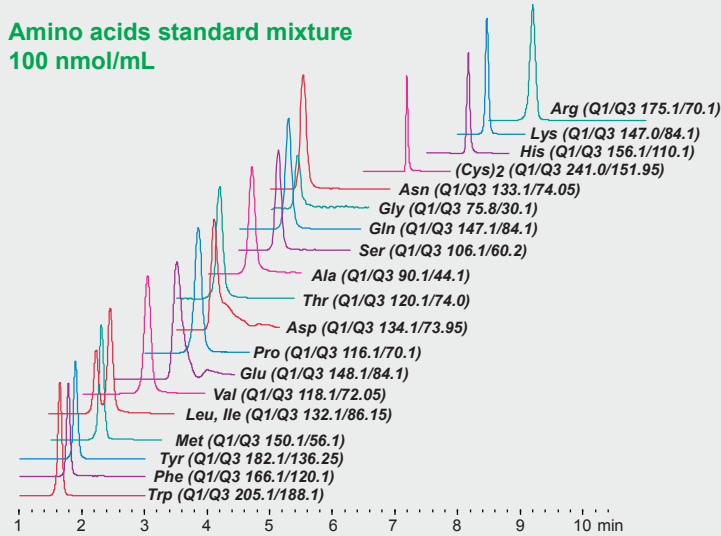
After the column has been used for analysis, please replace with the initial gradient mobile phase and store at room temperature.

## WARNINGS

- The Intrada Amino Acid column should be used only for LC-MS. This product is not recommended for applications with UV or ELSD detection systems, in order to avoid peak identification failure.
- Because detection sensitivity depends highly on MS instrument performance, proper LC-MS instruments should be carefully chosen for individual analysis purposes or sensitivity.
- Method development (column dimensions, gradient conditions, sample preparation, standard curve, etc.) and validation are required to achieve an optimized analytical method.
- Amino acid surrogate compounds using an isotope internal standard may be useful for high sensitive probe assays
- Injection solution requires acidic conditions using 0.1N HCl or 0.1-2% HCOOH etc. for peak shape and reproducibility.
- Final 0.2N HClO<sub>4</sub> for sample preparation is recommended to remove proteins from serum.
- Please refer to general methods for sample preparations for amino-acid composition analysis.

## Mobile Phase Preparation (General conditions for protein amino acids)

Amino acids standard mixture  
100 nmol/mL



**Intrada Amino Acid, 50 x 3 mm**

**A: CH<sub>3</sub>CN / THF / 25 mM HCOONH<sub>4</sub> / HCOOH = 9 / 75 / 16 / 0.3 (v/v/v/v)**

**B: ACN / 100 mM HCOONH<sub>4</sub> = 20 / 80 (v/v)**

**0 %B (0-3 min)**

**0-17 %B (3-6.5 min)**

**100 %B (6.5-10 min)**

**0.6 mL/min, 40 deg.C, 1 uL (0.1N HCl)**

**ESI, positive**

## Examples for simple gradient elution

### Standard Amino Acids

**Intrada Amino Acid, 50 x 3 mm**

**A: acetonitrile / HCOOH = 100 / 0.1**

**B: 100mM HCOONH<sub>4</sub>**

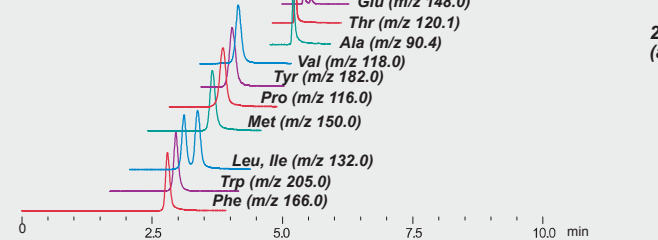
**14 %B (0-3min)**

**14-100 %B (3-10 min)**

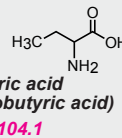
**14 %B (10-12 min)**

**0.6 mL/min, 35 deg.C, 5 uL**

**ESI, positive**



### Amino Acid Isomers



**Intrada Amino Acid, 75 x 2 mm**

**A: acetonitrile / HCOOH = 100 / 0.3**

**B: 100 mM HCOONH<sub>4</sub>**

**15-100 %B (0-8 min)**

**15 %B (8-10 min)**

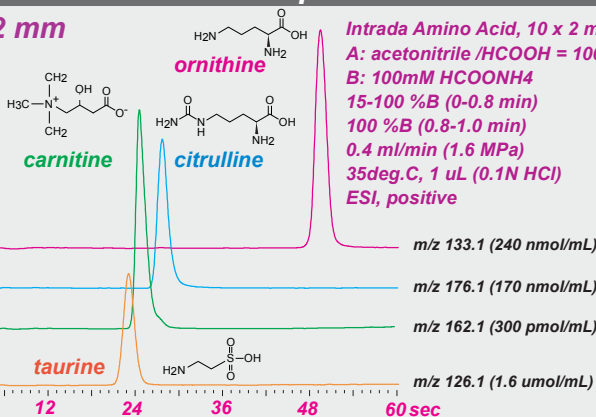
**0.3 mL/min, 35 deg.C**

**5 uL (0.1N-HCl aq.)**

**ESI (positive, m/z 104.1)**

## Amino acid related compounds

**10 x 2 mm**



**Intrada Amino Acid, 10 x 2 mm**

**A: acetonitrile / HCOOH = 100 / 0.1**

**B: 100mM HCOONH<sub>4</sub>**

**15-100 %B (0-8 min)**

**100 %B (8-10 min)**

**0.4 ml/min (1.6 MPa)**

**35deg.C, 1 uL (0.1N HCl)**

**ESI, positive**

## ANALYTICAL CONDITIONS PROTOCOL

Several parameters below should be tried for analytical optimization.

**A: acetonitrile / HCOOH = 100 / (0.1 - 0.5), v/v**

**B: (50-200mM) HCOONH<sub>4</sub>**

**Initial - Final %B (Gradient Time)**

**Flow Rate: depends on column I.D.**

**Temperature: up to 65deg.C**

**Injection Solution: 0.1N HCl or 0.1 - 2% HCOOH**

**MS detection: ESI, positive**

このたびは高速液体クロマトグラフィーカラム Intrada(イントラーダ)をお買いあげいただきまことにありがとうございます。

Intrada Amino Acid は、非ラベル化(インタクト)アミノ酸をLC-MSで分析するためのカラムで、以下の特長があります。

LC-MS(/MS)でアミノ酸および関連化合物の定量が可能  
目的のアミノ酸の組合せに適應する豊富なカラムサイズ

### 製品仕様

製品名: Intrada Amino Acid  
 基材: 高純度球状シリカ  
 粒子径: 3 $\mu$ m  
 固定相: アミノ酸分離専用固定相  
 カラム内径: 3, 2, 1mmおよびマイクロ・ナノカラム  
 カラム長: 10,20,30,50,75,100,150,250mm

## ■ 一般的留意点

### ●カラムの取扱

カラムそのものを落としたりぶつけたりしないでください。過度の衝撃はカラム性能を低下させる恐れがあります。エンドフィッティングを締めたり緩めたりしないでください。液漏れや異常圧力の原因となります。

### ●カラムの接続と取り外し

カラムラベルにはFLOWのマークがあります。溶離液の流れの方向に合わせて接続してください。接続や取り外しにスパナ(レンチ)を使用される場合は、必ずラインに近い方のエンドフィッティング部分にスパナをかけてください。カラム管にはスパナをかけないでください。液漏れ等のトラブルの原因となります。

### ●移動相および試料のろ過

注入試料溶液や移動相はあらかじめ0.45 $\mu$ mや0.2 $\mu$ mなどのメンブランフィルタでろ過してから使用してください。浮遊物や析出物がある場合は、カラムの目づまりによる圧力上昇のトラブルの原因となります。特に水系移動相の微生物汚染にご注意ください。

### ●装置環境

本カラムは、LC-MS(高速液体クロマトグラフ質量分析装置)専用です。  
 分析感度は各種MSの性能に依存しますので、装置の選択や溶出条件の工夫が必要です。  
 カラム接続配管(インジェクタ-カラム間、カラム-検出器間)の長さはできるだけ短くしてください。  
 長さ30mm以下のなどのショートカラムで高速グラジエント分析をおこなう場合、遅れ容量を小さくするために、できるだけ小容量のミキサをご使用ください。

## ■ 使用方法 (分析条件の設定や使用上の留意点については裏面をご参照ください)

### ●カラム封入溶媒

本カラムの出荷時封入溶媒は、アセトニトリル/水= 92/8 です。

### ●移動相の調製

本カラムを用いてアミノ酸を分析する場合、2種類の移動相によるグラジエント溶出が基本となります。  
 また、イオン性のアミノ酸を保持させるために、pH調整剤(ギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなど)が必須です。  
 使用できる基本的な有機溶媒は、アセトニトリル、メタノール、テトラヒドロフラン(THF)などです。  
 有機溶媒100%から水系溶媒100%まで使用することができます。  
 目的のアミノ酸分析に応じた溶出条件(移動相など)の最適化を実施してください。移動相組成の例は裏面をご参照ください。

### ●流量

一般的な3 $\mu$ mシリカカラムと同程度の流量が設定できます。ただし分離特性や溶媒消費量、カラム圧力、温度などを考慮して、最適な流量を検討してください。いずれのカラムサイズも最大使用圧力を超えないような設定をしてください。

#### 推奨流量 (カラム長さや目的によって調整してください)

カラム内径	1mm	2mm	3mm
推奨流量 (mL/min)	0.03-0.2	0.1-0.6	0.2-1.0

### ●圧力

最大使用圧力 約50MPa です。

### ●カラム温度

カラム温度範囲は15 - 65  $^{\circ}$ Cが適当です。ピーク形状や保持・分離特性などを考慮してカラム温度を設定してください。ただし、長期間の高温・高pH条件ではカラム寿命が低下する恐れがありますのでご注意ください。

### ●pH

本カラムの一般的な使用pH範囲は 1.5 - 8 です。アルカリ側で長期間使用する場合、有機溶媒濃度やpH調整剤の組成、温度、あるいは溶質の構造などの分析条件によってカラム寿命が異なります。それぞれ目的に合わせて検討してください。  
 また、アルカリ下で使用したあとに長期間カラムを保存する場合は、必ずカラム保存溶媒に置換して保管してください。  
 長期間アルカリ状態におくことはカラム寿命を低下させる原因となりますのでご注意ください。

### ●カラム洗浄について

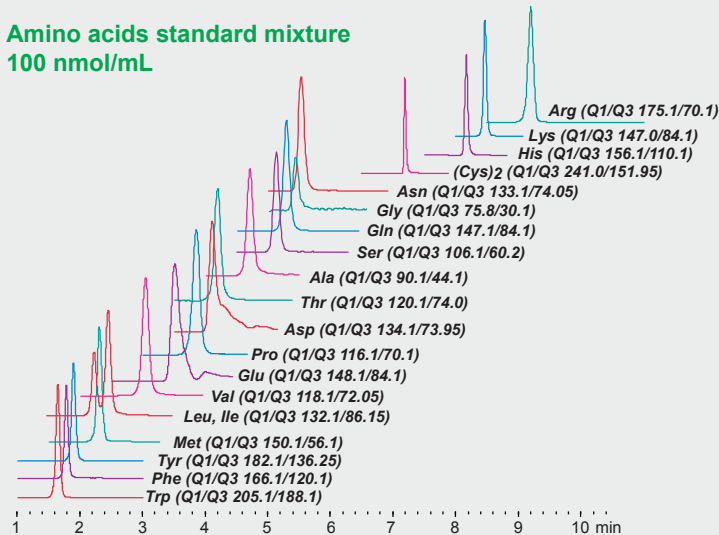
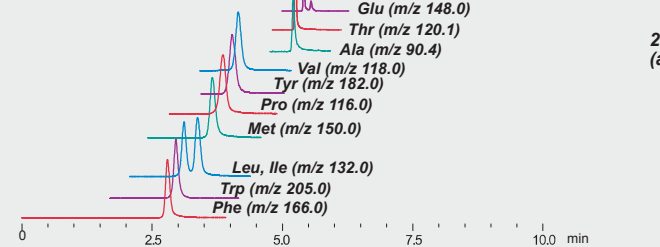
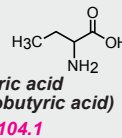
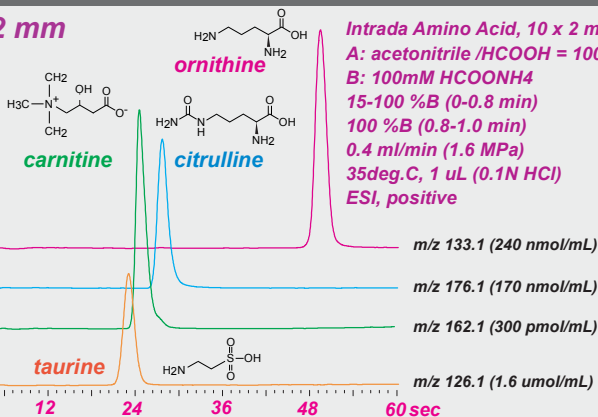
基本的なカラム洗浄溶媒は、100mM ギ酸アンモニウムです。約1時間通液し、純水を約30分通液してから、初期の移動相に置換してください。  
 タンパク質などの高分子がカラムに混入した場合は、カラムの性質上、洗浄による回復は困難です。カラム圧力を上昇させないための前処理方法をご確認ください。

### ●カラム保存溶媒

分析終了後のカラムは、分析初期移動相で置換後、室温で保存してください。

**留意点**

- 本製品は、LC-MS専用のアミノ酸・関連化合物分析用カラムです。UVやELSDなどによる検出は、ピークの同定が不確実となりますのでご使用を避けてください。
- 分析感度は使用される質量分析装置に依存しますので、分析目的や必要感度に適した装置を選択してください。
- 本製品をご使用の際には一般化合物と同様に、前処理方法、カラムサイズ、グラジエント条件、検量線など、HPLC分析条件の最適化をそれぞれのメソッドごとに実施してください。
- 微量アミノ酸の精密分析をする場合には、必要に応じてアミノ酸同位体を内部標準としてご検討ください。
- 注入試料溶液は酸性pHであることが必要です。一般には 0.1N HCl や 0.1-2% HCOOH で希釈してください。
- 除蛋白が必要な場合は、終濃度0.2N 過塩素酸を使用し、遠心ろ過することをおすすめします。
- アミノ酸組成分析など、従来からのアミノ酸分析法における前処理方法をご参照ください。

**移動相の調製 (タンパク質を構成するアミノ酸の一般的分析方法)**
**Amino acids standard mixture**  
**100 nmol/mL**

**Intrada Amino Acid, 50 x 3 mm**
**A: CH<sub>3</sub>CN / THF / 25 mM HCOONH<sub>4</sub> / HCOOH**  
**= 9 / 75 / 16 / 0.3 (v/v/v/v)**
**B: ACN / 100 mM HCOONH<sub>4</sub> = 20 / 80 (v/v)**  
**0 %B (0-3 min)**
**0-17 %B (3-6.5 min)**
**100 %B (6.5-10 min)**
**0.6 mL/min, 40 deg.C, 1 uL (0.1N HCl)**
**ESI, positive**
**簡便な溶出条件の例**
**標準アミノ酸**
**Intrada Amino Acid, 50 x 3 mm**
**A: acetonitrile / HCOOH = 100 / 0.1**
**B: 100mM HCOONH<sub>4</sub>**
**14 %B (0-3min)**
**14-100 %B (3-10 min)**
**14 %B (10-12 min)**
**0.6 mL/min, 35 deg.C, 5 uL**
**ESI, positive**

**アミノ酸異性体**

**Intrada Amino Acid, 75 x 2 mm**  
**A: acetonitrile / HCOOH = 100 / 0.3**  
**B: 100 mM HCOONH<sub>4</sub>**  
**15-100 %B (0-8 min)**  
**15 %B (8-10 min)**  
**0.3 mL/min, 35 deg.C**  
**5 uL (0.1N-HCl aq.)**  
**ESI (positive, m/z 104.1)**
**アミノ酸関連化合物**
**10 x 2 mm**

**Intrada Amino Acid, 10 x 2 mm**
**A: acetonitrile / HCOOH = 100 / 0.1**
**B: 100mM HCOONH<sub>4</sub>**
**15-100 %B (0-0.8 min)**
**100 %B (0.8-1.0 min)**
**0.4 ml/min (1.6 MPa)**
**35deg.C, 1 uL (0.1N HCl)**
**ESI, positive**
**汎用的な分析条件設定方法**

分析条件の最適化に関しては、以下のいくつかの要因についてご検討ください。

**A: acetonitrile / HCOOH = 100 / (0.1 - 0.5), v/v**
**B: (50-200mM) HCOONH<sub>4</sub>**
**Initial - Final %B (Gradient Time)**
**Flow Rate: depends on column I.D.**
**Temperature: up to 65deg.C**
**Injection Solution: 0.1N HCl or 0.1 - 2% HCOOH**
**MS detection: ESI, positive**