

Wie Sie eine geeignete Phenylsäule auswählen! Nicht alle Phenylsäulen sind gleich

Die Säulenklassifizierung nach USP (United States Pharmacopoeia) ist eine sehr praktische Übersicht. Doch stößt diese Gliederung auch an Grenzen. Wie für alle anderen Säulenmodifikationen klassifiziert die USP auch Phenylsäulen. Unter der Nummer USP L11 findet sich folgender Eintrag: chemisch an poröses Silica gebundene Phenylgruppen – 1,5–10µm Durchmesser. Diese Beschreibung umfasst alle Säulenmaterialien mit einer Phenylmodifikation, die unterschiedlich aufgebaut sein können. Mögliche Variationen unterscheiden sich durch die Länge und die Art der Verlinkung. Wie kann chromatographisches Verhalten dadurch beeinflusst werden? Diese Tech Note beleuchtet die Selektivität von drei unterschiedlichen Phenylphasen anhand der Trennung von Peptiden.

Diese drei Phasen werden verglichen:

- **YMC-Triart Phenyl:** basiert auf Hybrid-Silica-Partikel mit Butyl-Linker, so dass der Aromat dichter an der Phasenoberfläche ist.
- **YMC-Pack Ph:** silicabasiert ohne Linker, mit dem kleinstmöglichen Abstand zwischen Phasenoberfläche und Modifikation.
- **Luna Phenyl-Hexyl:** silicabasiert mit Hexyl-Linker, einem größeren Abstand des Aromaten zur Oberfläche.

Welchen Einfluss haben Basismaterial und Linker für die Gewichtung von hydrophoben und π - π -Wechselwirkungen? Welchen Einfluss haben hydrophobe Wechselwirkungen bei einem längeren Linker?

Tabelle 1: Spezifikationen der Phenylphasen mit unterschiedlichen Modifikationen.

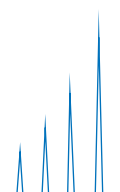
	YMC-Triart Phenyl	YMC-Pack Ph	Luna Phenyl-Hexyl
Basispartikel	Organisch-anorganisches Hybrid-Silica	Silica	Silica
Linker	Butyl	ohne	Hexyl
Partikelgröße [µm]	1,9; 3; 5	3; 5	3; 5
Porengröße [nm]	12	12	10
Spezifische Oberfläche [m²/g]	360	330	400
Kohlenstoffgehalt [% C]	17	9	17,5
pH Bereich	1–10	2,0–7,5	1,5–9
Temperaturlimit [°C]	50	50	60*
Endcapping	Mehrfach	Standard	Standard

*abhängig von Methodenbedingungen

Zur Untersuchung des unterschiedlichen Trennverhaltens wurden folgende fünf Peptide als Probe zusammengestellt:

- Oxytocin (1)
- Met-Enkephalin (2)
- Leu-Enkephalin (3)
- Neurotensin (4)
- γ -Endorphin (5)

Die Elutionsreihenfolge ist in den Klammern angegeben.



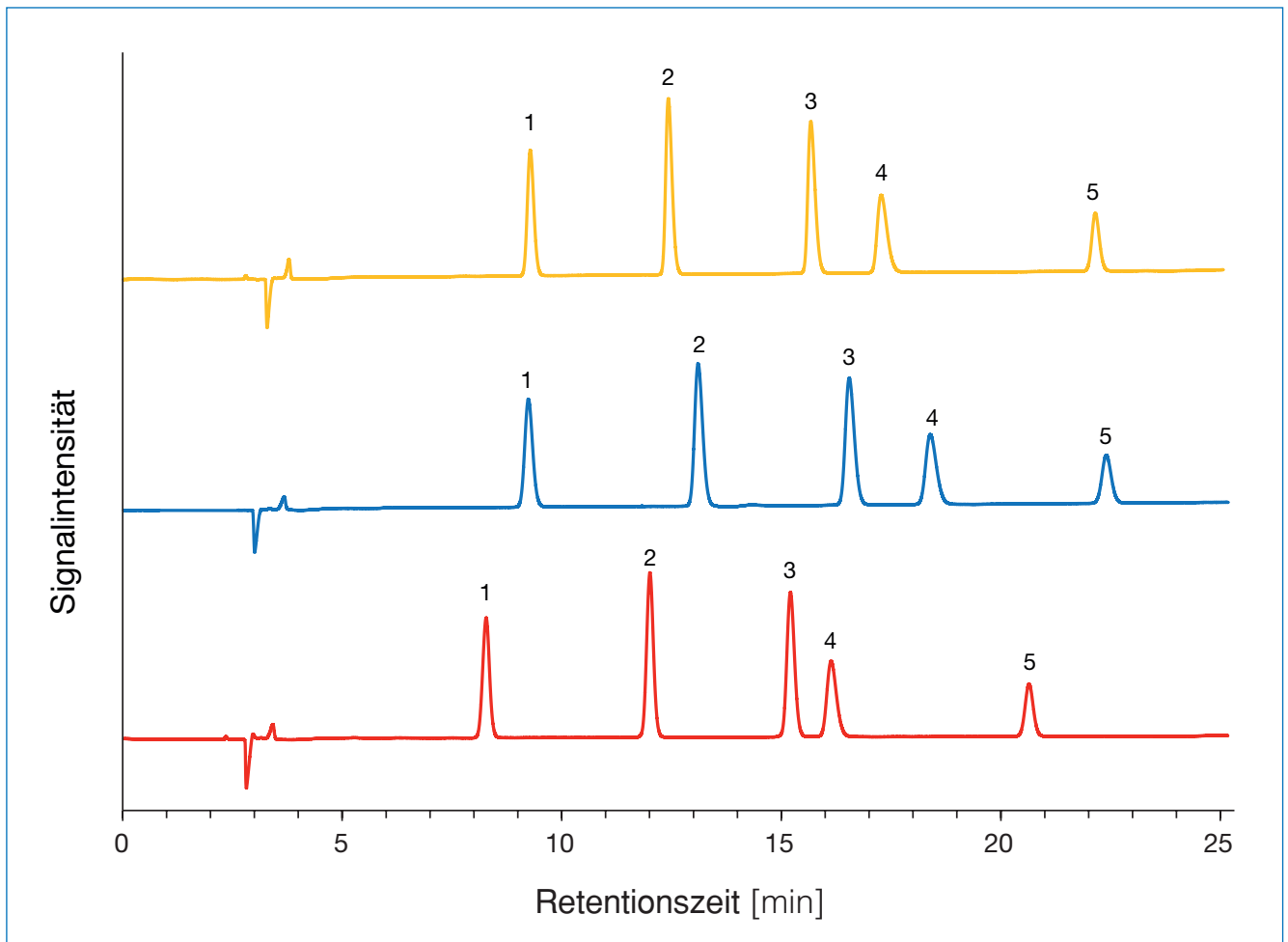


Abbildung 1: Trennung von 5 Peptiden unter der Verwendung von YMC-Pack Ph (gelb), YMC-Triart Phenyl (blau) und Luna Phenyl-Hexyl (rot).

Tabelle 2: Chromatographische Bedingungen.

Säulen:	YMC-Triart Phenyl (5 μ m, 12 nm) 250 x 4,6 mm ID YMC-Pack Ph (5 μ m, 12 nm) 250 x 4,6 mm ID Luna Phenyl-Hexyl (5 μ m, 10 nm) 250 x 4,6 mm ID
Artikelnr. (YMC):	TPH12S05-2546PTH PH12S05-2546WT
Eluenten:	A) Wasser + 0,1 % TFA B) Acetonitril + 0,1 % TFA
Gradient:	20–40 % B (0–45 min)
Flussrate:	1 mL/min
Temperatur:	25 °C
Injektion:	10 μ L
Probe:	0,167 mg/mL je Peptid gelöst in Wasser
Detektion:	UV bei 220 nm

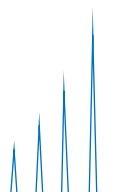


Tabelle 3: Trennfaktor α

Peakpaar	YMC-Triart Phenyl	YMC-Pack Ph	Luna Phenyl-Hexyl
1, 2	1,56	1,48	1,63
2, 3	1,32	1,33	1,33
3, 4	1,13	1,12	1,07
4, 5	1,25	1,34	1,33

Tabelle 4: Auflösung R_s

Peakpaar	YMC-Triart Phenyl	YMC-Pack Ph	Luna Phenyl-Hexyl
1, 2	11,3	11,4	12,8
2, 3	9,4	11,2	10,4
3, 4	4,4	4,4	2,5
4, 5	9,4	13,1	11,9

Abbildung 1 zeigt, dass alle drei Phasen für die Trennung der Peptide geeignet sind, jedoch sind auch klare Unterschiede erkennbar. So zeigt **YMC-Pack Ph** insgesamt die beste Selektivität und Auflösung mit scharfen Peaks für alle Peptide. **YMC-Triart Phenyl** weist eine leicht höhere Retention für die Peaks 2–4 auf. Unter Betrachtung der kritischen Peaks 3 und 4 bietet Luna Phenyl-Hexyl die geringste Auflösung. Außerdem zeigt diese Säule eine geringere Retention der Peptide. Dies überrascht, da für eine größere spezifische Oberfläche und einen höheren Kohlenstoffgehalt eher eine höhere Retention erwartbar ist. Für die hier analysierten Peptide scheint jedoch die Hydrophobizität der Säule nur einen limitierten Einfluss auf die Retention zu haben.

Für diese Applikation scheint eine Säule mit überwiegenderen π - π -Wechselwirkungen am besten geeignet zu sein, da die Peptide mit aromatischen Seitenketten eine höhere Retention mit **YMC-Pack Ph** und **YMC-Triart Phenyl** aufzeigen. Dies weist darauf hin, dass Phenylsäulen ohne oder mit kurzem Linker besser für die Trennung von Peptiden mit vielen aromatischen Seitenketten geeignet sein können. Im Allgemeinen ist es sinnvoll, eine Phase mit ausgeglichenen hydrophoben und π - π -Wechselwirkungen wie **YMC-Triart Phenyl** zu verwenden, die ebenfalls exzellente Ergebnisse für diese Trennung erzielte.

