

Le succès d'une séparation chromatographique est jugé par la capacité du système à distinguer un pic d'analyte d'un autre. La résolution (R_s) est définie comme le rapport de la **différence de temps de rétention** (Δt_R) entre les **deux pics** (t_{RA} et t_{RB}) sur la **moyenne** (w_{av}) de leurs **largeurs de base** (w_A et w_B) :

$$R_S = \frac{\Delta t_R}{W_{av}} = \frac{2(t_{R_B} - t_{R_A})}{W_A + W_B} \quad (1)$$

Lorsque $R_S = 1.0$, la **séparation** des **deux pics** est **complète** à **97,7 %** (le chevauchement est donc de **2,3 %**). Lorsque $R_S = 1.5$, le chevauchement est réduit à **0,2 %**. Les **pics non résolus** sont **appelés pics fusionnés**. La résolution est influencée par l'efficacité de la colonne, les facteurs de sélectivité et les facteurs de rétention selon l'équation 1 :

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_{av}} \right) \quad (2)$$

Où k_2 est le **facteur de rétention** pour le **pic retenu le plus longtemps** et k_{av} est le **facteur moyen de rétention** pour les **deux analytes**. L'équation 2 est l'une des **plus importantes** dans la **chromatographie**, elle permet d'**améliorer** de la **résolution entre** les **analytes**. **Par exemple**, on peut voir que la **résolution augmente** avec \sqrt{N} .

Puisque **N** est **lié** à la **longueur** de la **colonne**, **doubler** la **longueur** de la **colonne** **augmentera** la **résolution** de $\sqrt{2}$, (facteur de 1,4) et n'est en général pas le **moyen préféré** pour **améliorer** la **résolution**. Étant donné que les **facteurs** de **réten**tion et les **facteurs** de **sélectivité** sont **liés** aux **temps** de **réten**tion et aux **volumes** de **réten**tion, la **modification** de la **nature** des **deux** **phases** ou de leurs **volumes relatifs** aura un **impact** sur la **résolution**.

Les **facteurs de rétention dépendent** également des **coefficients de distribution**, qui à leur tour **dépendent** de la **température** ; par conséquent, la **modification** de la **température** de la **colonne** peut **améliorer** la **résolution**.

La **capacité** d'une **séparation chromatographique particulière** est une **mesure** de la **quantité** de **matière** qui peut être **résolue** en ses **composants** sans **provoquer** de **chevauchement** ou de **frontage** des **pics**. La **chromatographie échangeuse d'ions** a une **capacité élevée**, c'est pourquoi elle est **souvent utilisée** dans les **premières étapes** d'un **processus** de **purification**.

Exemple 1. Calcul de la résolution de deux analytes

Deux analytes **A** et **B** ont été séparés sur une colonne de **25 cm** de **long**. Les t_r observés étaient respectivement de **7 min 20 s** et **8 min 20 s**. La **largeur** du **pic** de **base** pour l'analyte **B** était de **10 s**. Lorsqu'un **composé** de **référence**, **complètement exclu** de la phase **stationnaire** dans les **mêmes conditions d'élution**, a été étudié, son t_m était de **1 min 20 s**.

Quelle était la **résolution** des **deux analytes** ?

Réponse

Afin de calculer la **résolution** requise, il faut d'abord calculer d'autres paramètres chromatographiques.

(i). Temps de rétention réduit (**ajusté**) (t'_R) :

Le **temps de rétention réduit (ajusté)** pour **A** et **B** basé sur l'équation 1 :

$$\underline{t'_R} = \underline{t_R} - \underline{t_M}$$

Pour l'analyte **A** (t'_R) = 440 - 80 = 360 s ;

Pour l'analyte **B** (t'_R) = 500 - 80 = 420 s.

(ii). Facteur de Sélectivité (k) :

Le facteur de rétention pour **A** et **B** basé sur l'équation 2 :

$$\underline{k = t_R / t_M}$$

Pour l'analyte **A** : $k_A = 360/80 = 4,5$;

Pour l'analyte **B** : $k_B = 420/80 = 5,25$.

(iii). Facteur de sélectivité (α) :

Le facteur de sélectivité pour les deux analytes basé sur l'équation 3 :

$$\alpha = k_B / k_A$$

$$\alpha = 5,25 / 4,5 = 1,167.$$

(iv) . Nombre de plateaux théoriques (**N**) :

Le nombre de plateaux théoriques dans la colonne ; basé sur l'équation 4 :

$$\underline{N = (t_R / \omega)^2 \text{ for analyte B}}$$

$$N = (420 / 10)^2 = 1764.$$

(v). La resolution (R_s) :

La résolution des deux analytes basée sur l'équation 2 :

$$R_s = (\sqrt{N}/4)[(\alpha-1)/\alpha] (k'_B/(1 + k_{av}))$$

Donne :

$$R_s = (\sqrt{1764}/4) (0,167/1,167) (5,25/1 + 4,875) = 1,34.$$

Discussion

Dr Laib

D'après la discussion précédente sur la **résolution**, il est évident qu'une **résolution** = 1,34 donne une **séparation** des **pics** supérieure à 99 %. S'il était nécessaire d'**augmenter** cette **séparation**, il serait possible de **calculer** la **longueur** de la **colonne nécessaire** pour **doubler** la **résolution**. La **résolution** est **proportionnelle** à la **racine carrée** de **N**, pour **doubler** la **résolution**, le **nombre** de **plateaux** **théoriques** dans la **colonne** doit être **multiplié** par $4 = 4 \times 1764 = 7056$.

La hauteur des plateaux dans la colonne **H = L/N** :

$$250/1764 = 0,14 \text{ mm.}$$

Pour obtenir 7056 plateaux dans la colonne, sa

longueur doit être augmentée à $0,14 \times 7056 = 987,84$

mm ou 98,78 cm.