



MÉTHODE D'ANALYSE

DÉTERMINATION DU POURCENTAGE DE 2-GLYCÉRIL MONOPALMITATE

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode décrit la procédure analytique pour la détermination du pourcentage d'acide palmitique en position 2 des triglycérides au moyen de l'évaluation du 2-glycéryl monopalmitate.

AVERTISSEMENT : Cette méthode peut requérir l'emploi d'appareils et de produits chimiques dangereux, ainsi que la réalisation d'opérations dangereuses. Elle ne spécifie pas tous les problèmes de sécurité liés à son emploi. Ses utilisateurs devront donc prendre préalablement toutes les mesures de sécurité appropriées et respecter la législation en vigueur.

Note : Cette méthode est applicable aux huiles végétales liquides à température ambiante (20 °C).

2. PRINCIPE

Après préparation, l'échantillon d'huile est soumis à l'action de la lipase pancréatique : une hydrolyse partielle et spécifique dans les positions 1 et 3 de la molécule de triglycéride entraîne l'apparition des monoglycérides en position 2. Le pourcentage de 2-glycéryl monopalmitate dans la fraction monoglycéridique est déterminé, après silanisation, par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

3. APPAREILLAGE ET MATÉRIEL COURANT

- 3.1. Erlenmeyer, 25 ml
- 3.2. Béchers 100, 250 et 300 ml
- 3.3. Colonne en verre pour chromatographie, diamètre intérieur 21-23 mm, longueur 400 mm, équipée d'une plaque en verre fritté et d'un robinet
- 3.4. Éprouvettes graduées de 10, 50, 100 et 200 ml
- 3.5. Ballons de 100 et 250 ml

- 3.6. Évaporateur rotatif
- 3.7. Tubes de centrifugeuse à fond conique de 10 ml, avec bouchon rodé
- 3.8. Centrifugeuse pour des tubes de 10 et 100 ml
- 3.9. Thermostat permettant de maintenir la température à $40 \pm 0,5$ °C
- 3.10. Pipettes graduées de 1 et 2 ml
- 3.11. Seringue hypodermique de 1 ml
- 3.12. Microseringue de 100 µl
- 3.13. Entonnoir, 1000 ml
- 3.14. Chromatographe en phase gazeuse pour colonnes capillaires, équipé d'un dispositif d'injection « on column » en froid et d'un four susceptible de maintenir la température choisie à ± 1 °C près
 - 3.14.1. Injecteur « on column » à froid
 - 3.14.2. Détecteur à ionisation de flamme équipé d'un électromètre
 - 3.14.3. Enregistreur-intégrateur adapté à l'électromètre avec une vitesse de réponse non supérieure à 1 seconde et une vitesse variable de déroulement du papier
- 3.15. Colonne capillaire en verre ou en silice fondue de 8 à 12 mètres, d'un diamètre intérieur de 0,25 à 0,32 mm, recouverte de methylpolysiloxane ou de phenil methylpolysiloxane 5%, d'une épaisseur de 0,10-0,30 µm, pouvant être utilisée à 370 °C
- 3.16. Microseringue de 10 µl munie d'une aiguille cémentée, d'au moins 7,5 cm de long, pour injection directe sur colonne

4. RÉACTIFS

- 4.1. Gel de silice ayant une granulométrie comprise entre 0,063 et 0,200 mm (70/280 mesh), préparé comme suit : mettre le gel de silice dans une capsule de porcelaine, sécher à l'étuve à 160 °C pendant 4 heures, puis laisser refroidir à température ambiante dans un dessiccateur. Ajouter un volume d'eau équivalent à 5% du poids du gel de silice, comme suit : dans un Erlenmeyer de 500 ml, peser 152 g de gel de silice et ajouter 8 g d'eau distillée, boucher et agiter délicatement pour obtenir une répartition uniforme de l'eau. Laisser reposer au moins 12 heures avant l'emploi.

- 4.2. n-hexane (pour chromatographie) (voir B.2). (L'hexane peut être remplacé par de l'isooctane (2,2,4- triméthylpentane en qualité chromatographique, voir B.3), à condition que des valeurs de précision comparables soient obtenues (voir les valeurs de précision de la méthode avec l'utilisation d'isooctane à la page 15).
- 4.2.1. Isopropanol
- 4.2.2. Isopropanol, solution aqueuse 1/1 (V/V)
- 4.3. Lipase pancréatique¹. La lipase utilisée doit avoir une activité comprise entre 2,0 et 10 unités de lipase par mg
- 4.4. Solution tampon de tris-hydroxy-méthylaminométhane : solution aqueuse 1 M amenée jusqu'à pH 8 (contrôle potentiométrique) par du HCl concentré (1/1 V/V)
- 4.5. Chololate de sodium, qualité enzymatique : solution aqueuse à 0,1% (cette solution doit être utilisée dans les 15 jours suivant sa préparation)
- 4.6. Chlorure de calcium, solution aqueuse à 22% (m/V)
- 4.7. Éther diéthylique pour chromatographie (voir B.1)
- 4.8. Solvant de développement : mélange n-hexane/éther diéthylique (87/13) (V/V)
- 4.9. Hydroxyde de sodium, solution à 12% (m/V)
- 4.10. Phénolphaléine, solution à 1% dans l'éthanol (m/V)
- 4.11. Gaz vecteur : hydrogène ou hélium, pour chromatographie en phase gazeuse
- 4.12. Gaz auxiliaires (voir B.7) : - hydrogène, à 99% minimum, exempt d'humidité et de substances organiques – et air, pour chromatographie en phase gazeuse de la même pureté
- 4.13. Réactif de silanisation : mélange pyridine/hexamethyldisilazane/trimethylchlorosilane 9/3/1 (V/V/V) (voir B.4, B.5 et B.6)
- 4.14. Échantillons de référence : monoglycérides purs ou mélanges de monoglycérides ayant une composition en pourcentage connue similaire à celle de l'échantillon

¹ Il existe dans le commerce des lipases pancréatiques ayant une activité comprise entre 2 et 10 unités par mg d'enzyme.

5. PROCÉDURE

5.1. Préparation de l'échantillon

5.1.1. Les huiles ayant une acidité libre inférieure à 3% n'ont pas besoin d'être neutralisées avant la chromatographie sur colonne de gel de silice. Les huiles ayant une acidité libre supérieure à 3% devront être soumises à la neutralisation conformément au point 5.1.1.1.

5.1.1.1. Dans l'entonnoir de 1000 ml (3.13), verser 50 g d'huile et 200 ml de n-hexane. Ajouter 100 ml d'isopropanol et une quantité de la solution d'hydroxyde de sodium à 12% (4.9.) correspondant à l'acidité libre de l'huile majorée de 5%. Agiter énergiquement pendant une minute. Ajouter 100 ml d'eau distillée, agiter de nouveau et laisser reposer.

Après décantation, éliminer la couche inférieure contenant les savons. Éliminer les éventuelles couches intermédiaires (mucilage et substances insolubles). Laver la solution hexanique de l'huile avec des portions successives de 50-60 ml de la solution isopropanol/eau (1/1, V/V) (4.2.2) jusqu'à disparition de la coloration rosée de la phénolphtaléine.

Éliminer la plus grande partie de l'hexane par distillation sous vide (utiliser par exemple un évaporateur rotatif) et transférer l'huile dans un ballon de 100 ml (3.5). Sécher l'huile sous vide jusqu'à élimination totale du solvant.

À la fin de cette opération, l'acidité de l'huile doit être inférieure à 0,5%.

5.1.2. Introduire 1,0 g d'huile préparée comme indiqué ci-dessus dans un Erlenmeyer de 25 ml (3.1) et dissoudre dans 10 ml de mélange de développement (4.8). Laisser reposer la solution pendant au moins 15 minutes avant la chromatographie sur colonne de gel de silice.

Si la solution est trouble, la centrifuger pour garantir des conditions optimales pour la chromatographie (*Note 1*).

Note 1 : Des cartouches de gel de silice SPE de 500 mg prêtes à l'emploi peuvent être utilisées.

5.1.3. Préparation de la colonne chromatographique

Verser dans la colonne (3.3) environ 30 ml du solvant de développement (4.8), introduire un morceau de coton dans la partie inférieure de la colonne à l'aide d'une baguette de verre ; presser pour éliminer l'air.

Dans un bécher, préparer une suspension de 25 g de gel de silice (4.1) dans environ 80 ml de solvant de développement et le verser dans la colonne à l'aide d'un entonnoir.

Vérifier que tout le gel de silice a été introduit dans la colonne ; laver avec le solvant de développement (4.8), ouvrir le robinet et laisser le niveau du liquide atteindre environ 2 mm au-dessus du niveau supérieur du gel de silice.

5.1.4. Chromatographie sur colonne

Dans un Erlenmeyer de 25 ml (5.1.2.), peser exactement 1,0 g d'échantillon préparé conformément au point 5.1.

Dissoudre l'échantillon dans 10 ml de solvant de développement (4.8). Verser la solution dans la colonne chromatographique préparée conformément au point 5.1.3. Éviter de remuer la surface de la colonne.

Ouvrir le robinet et laisser s'écouler la solution de l'échantillon jusqu'à ce qu'elle atteigne le niveau du gel de silice. Développer avec 150 ml de solvant de développement. Ajuster le débit à 2 ml/min (de façon à ce que 150 ml s'écoulent dans la colonne en 60-70 minutes environ).

Récupérer l'éluat dans un ballon de 250 ml préalablement taré. Évaporer le solvant sous vide et enlever les dernières traces de celui-ci sous un courant d'azote.

Peser le ballon et calculer l'extrait récupéré (*Note 2*).

Note 2 : En cas d'utilisation de cartouches SPE de silice prêtes à l'emploi (Note 1), procéder comme suit :

Introduire 1 ml de solution (5.1.2.) dans les cartouches préalablement préparées avec 3 ml de n-hexane.

Après percolation de la solution, développer avec 4 ml de n-hexane/éther diéthylique 9/1 (V/V).

Récupérer l'éluat dans un tube de 10 ml et le soumettre à évaporation sous un courant d'azote jusqu'à siccité.

Soumettre le résidu sec à l'action de la lipase pancréatique (5.2.). Il est fondamental de vérifier la composition en acide gras avant et après passage sur cartouche SPE.

5.2. Hydrolyse par la lipase pancréatique

5.2.1. Dans le tube de la centrifugeuse, peser 0,1 g de l'huile préparée conformément au point 5.1. Ajouter 2 ml de solution tampon (4.4.), 0,5 ml de la solution de cholate de sodium (4.5.) et 0,2 ml de la solution de chlorure de calcium, en agitant bien après chaque addition.

Fermer le tube avec le bouchon rodé et le placer dans le thermostat à $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Ajouter 20 mg de lipase, agiter soigneusement (en évitant de mouiller le bouchon) et mettre le tube dans le thermostat pendant exactement 2 minutes, puis le retirer, agiter énergiquement pendant 1 minute exactement et laisser refroidir.

5.2.3. Ajouter 1 ml d'éther diéthylique, boucher et agiter énergiquement, puis centrifuger et transférer la solution d'éther dans un tube propre et sec, à l'aide d'une microseringue.

5.3. Préparation des dérivés silanisés et de la chromatographie en phase gazeuse

5.3.1. À l'aide d'une microseringue, introduire 100 µl de solution (5.2.3.) dans un tube à fond conique de 10 ml.

Éliminer le solvant sous un léger courant d'azote, ajouter 200 µl de réactif de silanisation (4.13.), boucher le tube et laisser reposer pendant 20 minutes.

Après 20 minutes, ajouter 5 ml de n-hexane : la solution résultant est prête pour la chromatographie en phase gazeuse.

5.4. Chromatographie en phase gazeuse

Les conditions d'opération sont les suivantes :

Température de l'injecteur inférieure à la température d'ébullition du solvant (68°C)

Température du détecteur : 350 °C

Programmation de la température du four : 60 °C pendant 1 minute, en augmentant de 15 °C par minute jusqu'à 180 °C, puis de 5°C par minute jusqu'à 340 °C, puis 340 °C pendant 13 minutes

Gaz vecteur : hydrogène ou hélium, réglé à la vitesse linéaire adéquate en vue d'obtenir la résolution reflétée dans la **Figure 1**. Le temps de rétention du triglycéride C₅₄ doit être de 40 ± 5 minutes (voir **Figure 2**) (*Note 3*)

Quantité de substance injectée : 0,5-1 µl de la solution (5.3.1.).

Note 3 : Les conditions d'opérations indiquées ci-dessus sont proposées à titre indicatif. Chaque opérateur devra les optimiser pour atteindre la résolution désirée. La hauteur du pic correspondant au 2-glycéryl monopalmitate doit avoir une hauteur minimale égale à 10 % de l'échelle de l'enregistreur.

5.4.1. Identification des pics

Les monoglycérides individuels sont identifiés en fonction des temps de rétention obtenus et par rapport à ceux obtenus avec les mélanges standard de monoglycérides analysés dans les mêmes conditions.

5.4.2. Évaluation quantitative

L'aire de chaque pic est calculée au moyen d'un intégrateur électronique.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Le pourcentage de glycéryl monopalmitate est calculé à partir du rapport entre l'aire du pic correspondant et la somme des aires des pics de tous les monoglycérides (voir **Figure 2**), selon la formule :

$$\text{Glycéryl monopalmitate}(\%) : \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

où : A_x = aire du pic correspondant au glycéryl monopalmitate
 ΣA = somme des aires de la totalité des pics des monoglycérides

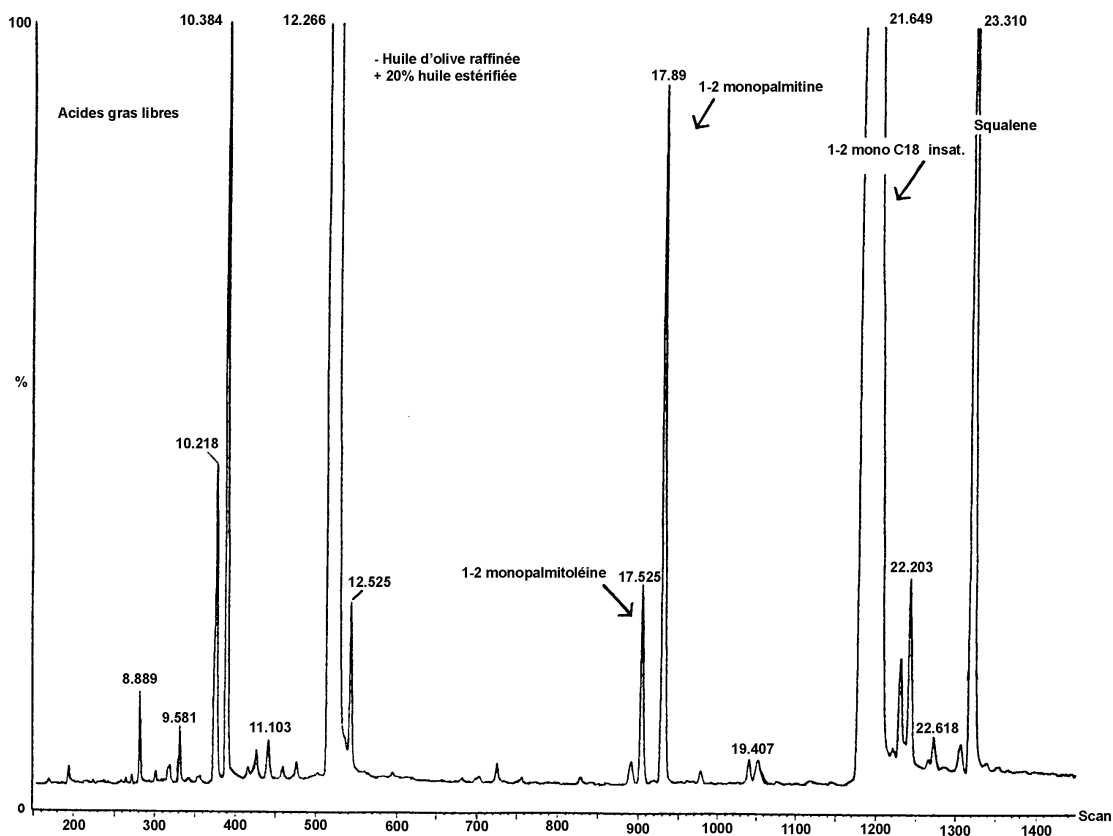
Le résultat doit être donné avec une décimale.

7. COMPTE-RENDU DE L'ANALYSE

Le compte-rendu de l'analyse devra spécifier :

- La référence à cette méthode ;
- Toute information nécessaire à l'identification complète de l'échantillon ;
- Le résultat de l'analyse ;
- Tout écart de cette méthode, qu'il s'agisse d'une décision des parties concernées ou pour une autre raison ;
- Les détails d'identification du laboratoire, la date de l'analyse et la signature des responsables de celle-ci.

Figure 1



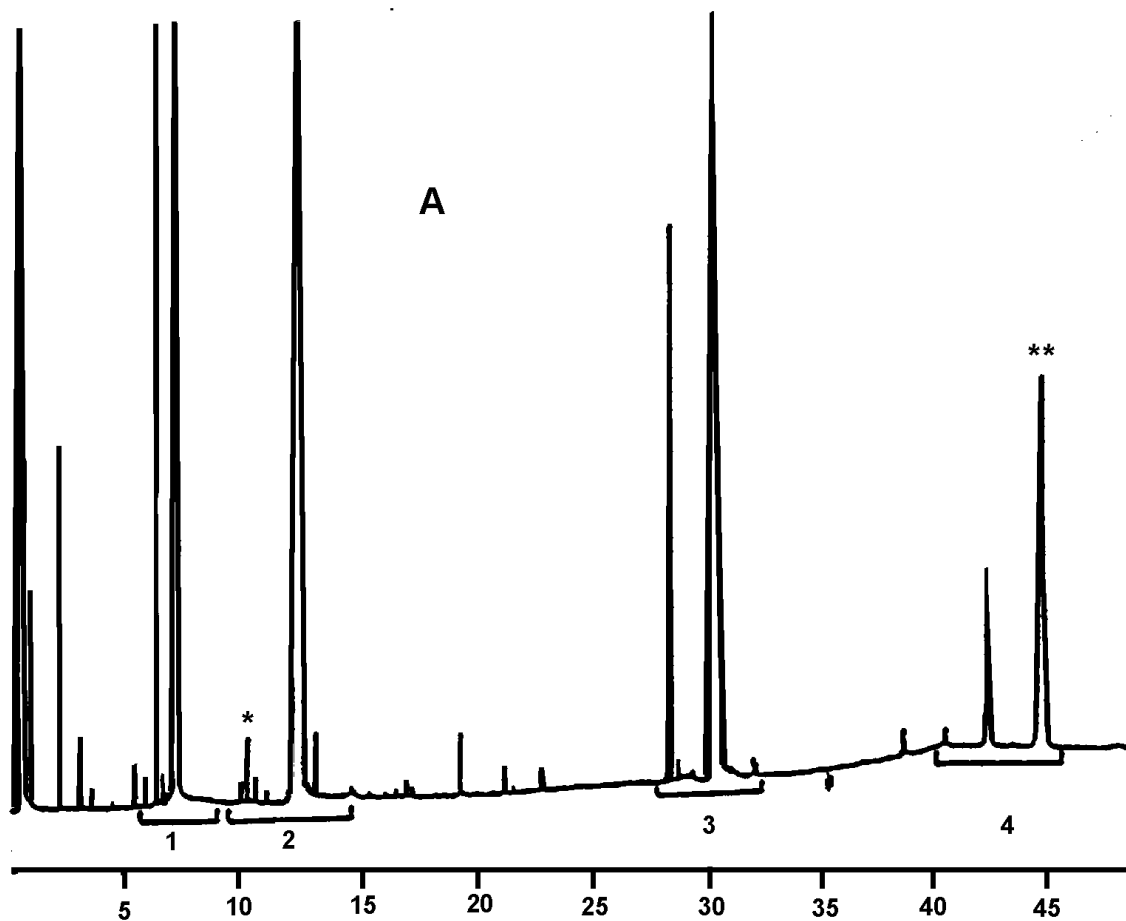
Chromatogramme des produits de la réaction de silanisation obtenus par l'action de la lipase sur une huile d'olive raffinée additionnée de 20% d'huile esterifiée (100%).

Figure 2

Chromatogramme de :

- A) Huile d'olive authentique, après lipase, après silanisation. Dans ces conditions (colonne capillaire 8 – 12 m), la fraction de cire est éluée en même temps que la fraction de diglycérade ou peu de temps après.

Après lipase, la teneur en triglycérades ne devrait pas excéder 15%.



Légende :

1.- Acides gras libres
2.- Monoglycérades

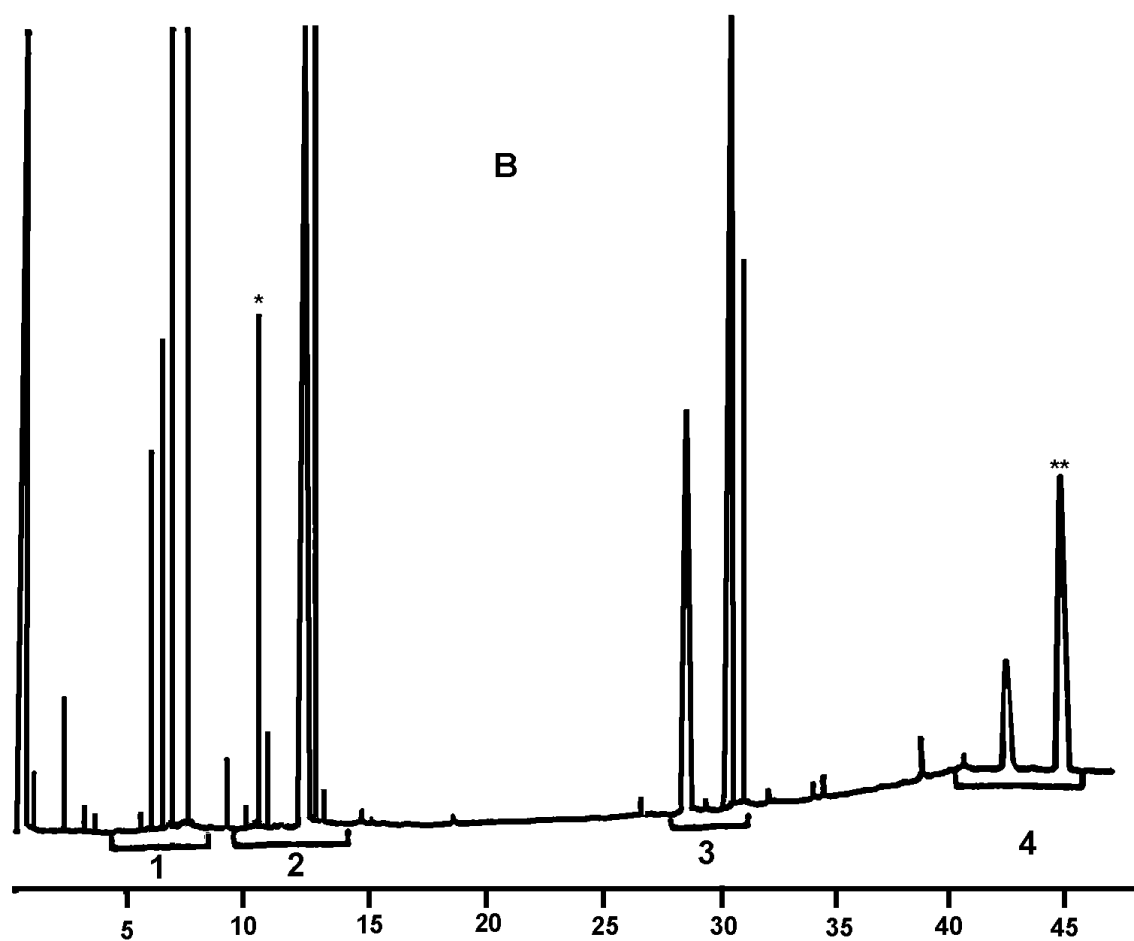
3.- Diglycérades
4.- Triglycérades

(*) = 2-monopalmitine
(**) = Triglycérade C₅₄

Chromatogramme de :

B) Huile estérifiée après lipase, après silanisation. Dans ces conditions (colonne capillaire 8 – 12 m), la fraction de cire est éluée en même temps que la fraction de diglycérade ou peu de temps après.

Après lipase, la teneur en triglycérades ne devrait pas excéder 15%.



Légende :

1.- Acides gras libres

2.- Monoglycérades

3.- Diglycérades

4.- Triglycérades

(*) = 2-monopalmitine

(**) = Triglycérade C₅₄

ANNEXE A

(informative)

A.1. PRÉPARATION DE LA LIPASE

Il existe dans le commerce des lipases ayant une activité satisfaisante. Il est également possible de les préparer au laboratoire de la façon suivante :

Refroidir à 0 °C 5 kg de pancréas frais de porc. Débarrasser de la graisse solide et du tissu conjonctif qui les entourent et les triturer dans un moulin à lames jusqu'à obtention d'une pâte fluide. Agiter cette pâte pendant 4 à 6 heures avec 2,5 litres d'acétone anhydre puis centrifuger. Extraire le résidu trois autres fois avec le même volume d'acétone anhydre, puis deux fois avec un mélange acétone/éther diéthylique (1/1) (V/V) et deux fois avec de l'éther diéthylique.

Sécher le résidu pendant 48 heures sous vide pour obtenir une poudre stable qui se conservera longtemps au réfrigérateur et à l'abri de l'humidité.

A.2. CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ LIPASIQUE

Préparer une émulsion d'huile d'olive comme suit :

Agiter pendant 10 minutes dans un mélangeur un mélange constitué de 165 ml de la solution de gomme arabique à 100 g/l, 15 g de glace pilée et 20 ml d'une huile d'olive préalablement neutralisée.

Introduire successivement 10 ml de cette émulsion dans un bécher de 50 ml puis 0,3 ml de la solution de cholate de sodium à 0,2 g/ml et 20 ml d'eau distillée.

Placer le bécher dans un thermostat réglé à 37 °C ; introduire les électrodes du pH-mètre et l'agitateur à hélice.

Ajouter goutte à goutte, à l'aide d'une burette, une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N jusqu'à obtention d'un pH de 8,3.

Ajouter un volume de suspension de poudre de lipase dans l'eau (0,1 g/ml de lipase). Dès que le pH-mètre indique un pH de 8,3, mettre en marche le chronomètre et ajouter la solution d'hydroxyde de sodium, goutte à goutte, au rythme nécessaire pour maintenir le pH à la valeur de 8,3. Noter chaque minute le volume de solution consommé.

Reporter les données dans un système d'axes de coordonnées en portant en abscisses les temps et en ordonnées les millilitres de solution alcaline 0,1 N consommés pour maintenir le pH constant. Un graphique linéaire doit être obtenu.

L'activité de la lipase, mesurée en unités lipase par mg, est donnée par la formule suivante :

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

où :

A est l'activité en unités lipase/mg ;

V est le volume de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N consommé par minute (calculé à partir du graphique), en ml ;

N est la normalité de la solution d'hydroxyde de sodium ;

m est la masse en mg de la lipase d'essai.

L'unité lipase est définie comme la quantité d'enzyme que libère 10 micro-équivalents d'acide par minute.

ANNEXE B

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

B.1. Éther diéthylique

Extrêmement inflammable, modérément toxique et irritant pour la peau. Toxique par inhalation. Peut être irritant pour les yeux. Danger d'effets cumulatifs. Peut former des peroxydes explosifs. Danger d'inflammation des vapeurs. Tenir à l'abri de toute source de chaleur, étincelle ou flamme nue. Vérifier la fermeture correcte des récipients. Bien ventiler pendant l'emploi. Éviter l'accumulation de vapeurs et éliminer toute cause possible d'incendie, notamment radiateurs ou tout appareil électrique qui ne soit pas conçu avec des matériaux ignifuges. Ne pas faire évaporer jusqu'à siccité ou quasi siccité. L'ajout d'eau ou d'un agent réducteur peut réduire la formation de peroxydes. Ne pas ingérer. Éviter de respirer les vapeurs. Éviter les contacts prolongés ou répétés avec la peau.

B.2. n-Hexane

Extrêmement inflammable. Danger d'inflammation des vapeurs. Tenir à l'abri de toute source de chaleur, étincelle ou flamme nue. Vérifier la fermeture correcte des récipients. Bien ventiler pendant l'emploi. Éviter l'accumulation de vapeurs et éliminer toute cause possible d'incendie, notamment radiateurs ou tout appareil électrique qui ne soit pas conçu avec des matériaux ignifuges. Dangereux en cas d'inhalation car peut affecter les cellules du système nerveux. Éviter de respirer les vapeurs en utilisant un appareil respiratoire approprié si nécessaire. Éviter tout contact avec les yeux et la peau.

B.3. Iso-octane (2,2,4-triméthylpentane)

L'isooctane est un liquide inflammable qui présente des risques d'incendie. Les limites d'explosivité dans l'air sont de 1,1 % à 6,0 % (fraction volumique). Il est toxique par ingestion et inhalation. Utiliser une hotte ventilée fonctionnant correctement pour travailler avec ce solvant.

B.4. Pyridine

Extrêmement inflammable. Toxique par inhalation, par contact avec la peau ou en cas d'ingestion. En cas de contact avec les yeux, laver abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

B.5. Hexamethyldisilazane

Liquide extrêmement inflammable. Conserver dans un récipient bien fermé à l'abri de l'humidité. Tenir à l'abri des flammes et des étincelles. Ne pas fumer.

B.6. Trimethylchlorosilane

Substance liquide facilement inflammable, irritante pour les yeux, pour les voies respiratoires et pour la peau. Conserver dans un récipient bien fermé à l'abri de l'humidité.

B.7. Hydrogène comprimé, en bonbonne

Extrêmement inflammable, sous pression. Tenir à l'abri de toute source de chaleur, étincelles, flammes nues ou tout appareil non fabriqué avec des matières ignifuges. Vérifier que la valve de la bonbonne soit bien fermée en cas de non-utilisation. Utiliser toujours avec un réducteur de pression. Baisser la tension du ressort du réducteur avant d'ouvrir la valve de la bonbonne. Ne pas se placer devant l'obturateur de la bonbonne au moment d'ouvrir la valve. Ventiler correctement pendant l'utilisation. Ne pas transférer l'hydrogène d'une bonbonne à une autre.

Ne pas mélanger le gaz dans la bonbonne. Entreposer les bonbonnes de façon à ce qu'elles ne puissent pas être renversées. Conserver à l'abri de la lumière du soleil et de toute source de chaleur. Conserver dans un environnement non corrosif. Ne pas utiliser de bonbonnes endommagées ou non étiquetées.

B.7. Air comprimé, en bonbonne

Gaz comprimé à haute pression. Utiliser avec prudence en présence de substances combustibles car la température d'auto-ignition de la plupart des composés organiques dans l'air diminue considérablement sous haute pression. Vérifier que la valve de la bonbonne soit toujours fermée en cas de non-utilisation. Utiliser toujours un réducteur de pression. Baisser la tension du ressort du réducteur avant d'ouvrir la valve de la bonbonne. Ne pas se placer devant l'obturateur de la bonbonne au moment d'ouvrir la valve.

Ne pas transférer le gaz d'une bonbonne à une autre. Ne pas mélanger le gaz dans la bonbonne. Entreposer les bonbonnes de façon à ce qu'elles ne puissent pas être renversées. Conserver à l'abri de la lumière du soleil et de toute source de chaleur. Conserver dans un environnement non corrosif. Ne pas utiliser de bonbonnes endommagées ou non étiquetées. L'air destiné à des usages techniques ne doit pas être utilisé pour des appareils respiratoires ou d'inhalation.

MARGES DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE

Les marges de précision de la méthode figurent dans le tableau ci-après.

L'essai circulaire pour l'obtention de ces données a été organisé par le Conseil oléicole international et coordonné par Enrico Tiscornia et Raffaella Boggia de l'Université de Gênes, avec la participation de 12 laboratoires de 5 pays.

L'essai a porté sur cinq échantillons différents et leurs répliqués correspondants (a et b). L'identification des échantillons est la suivante :

- A Huile d'olive vierge extra
- B Huile d'olive vierge lampante
- C Huile d'olive raffinée
- D Huile d'olive raffinée + huile réestérifiée (90:10)
- E Huile d'olive raffinée + huile réestérifiée (80:20)

L'analyse statistique des résultats de l'essai a été effectuée conformément aux règles établies dans les normes ISO 5725 « **Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure** ». Les valeurs aberrantes ont été déterminées par l'application du test de Cochran et du test de Grubbs sur les résultats des laboratoires pour chaque détermination (répliqués a et b) et chaque échantillon.

Le tableau fait état des éléments ci-après, dont la signification est la suivante :

- n** Nombre de laboratoires ayant pris part à l'essai
- outliers** Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
- mean** Moyenne des résultats acceptés
- r** Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage et pendant un court intervalle de temps (répétabilité)
- S_r** Écart-type de la répétabilité
- RSD_r (%)** Coefficient de variation de la répétabilité ($S_r \times 100 / \text{mean}$)
- R** Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95%, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels obtenus à l'aide de la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant un appareillage différent (Reproductibilité)
- S_R** Écart-type de la reproductibilité

RSD_R (%) Coefficient de variation de la reproductibilité (SR x 100 / mean)

Tableau 1

	A	B	C	D	E
n	12	12	12	12	12
outliers	0	0	0	0	0
mean	0,5	0,8	0,9	1,8	2,8
r	0,11	0,11	0,17	0,10	0,26
S_r	0,04	0,04	0,06	0,04	0,09
RSD_r(%)	8,9	5,4	6,8	2,0	3,3
R	0,14	0,27	0,26	0,56	0,86
S_R	0,05	0,10	0,09	0,20	0,31
RSD_R(%)	11,1	12,7	10,2	11,1	10,9

2. Analyse des résultats de l'essai collaboratif du COI en 2017 pour l'essai d'aptitude

Un seul échantillon d'huile d'olive vierge, adultérée avec 10% d'huile d'olive raffinée et 2% de graisse animale, a été testé.

Tableau 2 : 2-glycéryl monopalmitate

2-Glycéryl monopalmitate (%)	n	Moyenne consensus	S_r	S_R
Méthode réglementaire	23	1,8	0,03	0,08
Méthode solvant alternatif	23	1,8	0,03	0,08
Évaluation	Calculé	Limite	Conclusion/Commentaires	
Différence (Méthode réglementaire - Méthode solvant alternatif)	0,0			
Test F répétabilité	1,00	2,08	F cal < F limite	
Test F reproductibilité	1,13	2,08	F cal < F limite	
Reproductibilité courante Réglementaire	0,08	0,23	S _R obtenu inférieur à S _R courant	
T Student	1,29	2	t cal < t limite	

La *méthode réglementaire* consiste à utiliser de l'hexane comme solvant.

La *méthode solvant alternatif* consiste à utiliser de l'isooctane comme solvant.

La comparaison des résultats s'est concentrée sur l'évaluation comparative des variances, à la fois dans des conditions de reproductibilité, ainsi que sur l'existence d'un biais significatif ou non entre les valeurs assignées après l'application de la méthode réglementaire et celles obtenues après l'utilisation du solvant alternatif.

À cette fin, le Fisher des deux variances obtenues a été calculé, dans les deux conditions, ainsi que la statistique t de Student des deux populations étudiées, qui compare les deux moyennes obtenues et leurs variances respectives, dans des conditions de reproductibilité.

La valeur de précision actuellement publiée pour le niveau étudié a également été comparée, ainsi que celle obtenue avec l'utilisation de solvants alternatifs.
