



Centre de recherche, de développement et de transfert technologique acéricole inc.

Siège social et station expérimentale
142, rang Lainesse
Saint-Norbert d'Arthabaska, QC
G0P 1B0
Tél. 819 369-4000
Fax. 819 369-9589

RAPPORT FINAL

**Mise au point d'outils de mesure rapides pour la
détermination du taux de glucose et de sucre inverti
dans le sirop d'érable**

Par : Mustapha Sadiki, Ph.D., chimiste

Collaborateurs : Carmen Charron, Assistante de recherche
Karl Lambert, Technicien de laboratoire

Ce projet a été réalisé grâce à une aide financière accordée dans le cadre du Programme levier, volet 3.1, du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec. Le Centre ACER a contribué à hauteur de 50% au financement de ce projet.

Toute information contenue dans ce document est la propriété du Centre ACER.

Cette information ne peut pas être utilisée, reproduite ou transmise sans l'autorisation écrite du Centre ACER, à moins que ce ne soit pour usage personnel et non commercial. Lorsque de l'information issue de ce rapport est utilisée, reproduite ou transmise à une tierce personne, pour toute fin autorisée, il doit être clairement indiqué sur les documents utilisés, reproduits ou transmis que cette information est la propriété du Centre ACER.

RÉSUMÉ

La fiabilité de la mesure du taux du glucose et du sucre inverti dans le sirop d'érable est primordiale pour confectionner des produits dérivés stables et de qualité. Dans ce projet, deux méthodes de mesure rapides du taux du glucose sont proposées. Pour la méthode au glucomètre, trois modèles de glucomètres ont été évalués et les résultats montrent que le taux du glucose observé varie d'un appareil à l'autre. Le facteur de dilution peut également avoir un impact sur la fiabilité de la mesure au glucomètre. Ainsi, une procédure universelle pour la vérification de l'étalonnage et la correction de la lecture au glucomètre a été mise au point afin de permettre aux acériculteurs qui sont familiers avec cet appareil de continuer à l'utiliser. Cette étude a permis aussi de sélectionner un appareil qui n'est pas affecté par le niveau de dilution de l'échantillon de sirop et qui peut donc être recommandé pour l'analyse des sirops avec un taux de sucre inverti élevé (>2%).

Une méthode alternative au glucomètre a également été adaptée et validée pour la mesure du taux du glucose dans le sirop d'érable. La mesure est effectuée par colorimétrie après l'ajout d'un réactif spécifique au glucose (*Glucose oxydase, GOD*). La réaction est réalisée à température ambiante et le réactif utilisé est plus sécuritaire par rapport aux méthodes colorimétriques avec oxydation acide du glucose. Contrairement à certains glucomètres, cette méthode alternative n'est pas affectée par le facteur de dilution qui doit être appliqué aux échantillons de sirop. L'usage d'une solution standard pour le calcul du taux de glucose permettra également d'assurer une meilleure fiabilité des résultats d'analyse.

La relation entre le taux du glucose et le taux du sucre inverti a également été évaluée pour des échantillons de sirop d'érable qui sont exempts de défauts organoleptiques. Les mesures du taux de sucre inverti par chromatographie liquide confirme que la relation entre le taux du glucose et le taux du sucre inverti peut être généralisé même pour les sirops d'érable n'ayant pas subi d'hydrolyse ou d'inversion enzymatique. Ainsi, le taux du sucre inverti peut être obtenu en multipliant le taux du glucose par un facteur 2.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	4
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES	7
MISE EN CONTEXTE	8
INTRODUCTION	9
OBJECTIFS	11
MÉTHODOLOGIE	11
Révision et adaptation de la méthode de mesure du taux de glucose avec le glucomètre Mise au point d'une méthode alternative au glucomètre Estimation du taux de sucre inverti	
RÉSULTATS ET DISCUSSION	14
Évaluation des différents modèles de glucomètre Mise au point d'une méthode alternative par colorimétrie Estimation du taux de sucre inverti	
CONCLUSION	21
BIBLIOGRAPHIE	22
ANNEXES	23
Annexe1. Facteur de correction de la lecture du glucomètre en fonction du niveau de dilution de l'échantillon	
Annexe2. Procédure de la mesure au glucomètre et détermination du taux du sucre inverti	
Annexe3. Procédure de mesure du taux de glucose par la méthode enzymatique (GOD/PAP)	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Taux du glucose obtenu avec différents glucomètres pour des sirops fortifiés et non fortifiés.....	17
Tableau 2. Facteur de correction de la lecture des différents glucomètres.....	17
Tableau 3. Facteur de correction de la lecture du glucomètre en fonction du facteur de dilution de l'échantillon	23

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Lecture des solutions standards de glucose avec différents glucomètres.....	14
Figure 2. Taux du glucose mesuré au glucomètre et à la chromatographie liquide.....	15
Figure 3. Lecture corrigée du glucomètre versus le taux du glucose par chromatographie.....	18
Figure 4 : Linéarité et cinétique de la réaction enzymatique à température ambiante (22.5°C).....	19
Figure 5. Taux de glucose par colorimétrie (méthode enzymatique) versus chromatographie.....	19
Figure 6. Taux du fructose versus taux du glucose dans des échantillons de sirop d'érable.....	20

MISE EN CONTEXTE

En acériculture, le taux de glucose est utilisé comme paramètre de contrôle pour évaluer la sève d'érable et prédire la qualité du sirop d'érable qui sera produit par la suite. La mesure du taux de glucose permet également d'estimer le taux de sucre inverti et sélectionner ainsi le sirop d'érable qui conviendrait mieux à la production des produits dérivés (beurre d'érable, tire d'érable,...). L'outil de mesure rapide qui est largement utilisé par les acériculteurs pour estimer le taux de glucose est le glucomètre. Cet appareil est en principe conçu pour mesurer le taux de glucose dans le sang et avec les modifications apportées aux nouveaux glucomètres, des écarts de lecture par rapport au taux réel du glucose dans le sirop d'érable sont souvent constatés. Par conséquent, les producteurs acéricoles se retrouvent mal outillés pour évaluer le taux du glucose et sélectionner un sirop d'érable avec la teneur appropriée en sucre inverti lors de la production des produits dérivés. Sachant qu'une meilleure évaluation du taux du glucose ou du sucre inverti de la matière première est indispensable pour réussir la fabrication des produits dérivés stables et de qualité, il devient donc nécessaire de mettre au point un protocole de mesure rapide et fiable pour la détermination du taux de glucose et du sucre inverti dans le sirop d'érable.

INTRODUCTION

Le taux de glucose a été recommandé comme paramètre de contrôle pour évaluer la qualité de la sève d'érable et plus particulièrement la tendance d'une sève d'érable à donner un sirop ayant un défaut de goût majeur (*Dumont, 1999; Lagacé et Charron, 2008*). Ce paramètre permet aussi d'estimer le taux du sucre inverti dans le sirop d'érable utilisé pour la fabrication des produits dérivés (*Dumont, 1998; CTTA, 2004*). L'outil de mesure employé actuellement pour la détermination du taux de glucose dans la sève d'érable ou le sirop d'érable est le glucomètre (*Dumont, 1998; Childs & Chabot, 2007; Lagacé et Charron, 2008*).

Malgré que le glucomètre soit conçu principalement pour la détermination du taux de glucose dans le sang, des études réalisées par le centre ACER ont démontré que cet appareil pourrait également être adapté pour des mesures dans les produits de l'érable. Ces études ont également montrées que certains modèles de glucomètres peuvent être plus précis que d'autres et qu'on peut donc s'attendre à obtenir des lectures différentes d'un pareil à l'autre. Toutefois, les modèles de glucomètre qui avaient été jugés assez précis, tels que le '*Accu-Chek Advantage*' (*Dumont, 1998*) ou le '*One Touch Basic*' et le '*Ascensia Contour*' (*Lagacé et Charron, 2008*), ne sont plus disponibles sur le marché.

Actuellement, les acériculteurs qui veulent évaluer le taux de glucose avec le glucomètre constatent que les résultats obtenus avec les nouveaux glucomètres ne sont pas fiables. En effet, selon une vérification préliminaire, réalisée par le Centre ACER, les glucomètres '*Accu-Chek Aviva*' ainsi que '*Contour Next*', qui ont remplacé le '*Accu-Chek Advantage*' et le '*Ascensia Contour*' ont tendance à surestimer le taux de glucose dans le sirop d'érable. Ainsi, il devient indispensable d'évaluer les résultats obtenus par les nouveaux glucomètres par rapport à une méthode de référence telle que la chromatographie liquide. L'élaboration d'une procédure universelle pour corriger la lecture du glucomètre est également nécessaire de même que la mise au point d'un protocole d'étalonnage spécifique aux produits d'érable afin d'assurer une meilleure fiabilité des résultats obtenus avec cet appareil.

Bien que le glucomètre reste un outil rapide et facile à utiliser, des tests de validation doivent être effectués avec l'apparition de chaque nouveau modèle de glucomètre. Des protocoles analytiques par colorimétrie qui font appel à des réactions enzymatiques spécifiques au glucose peuvent être mis au point pour les produits de l'érable. Une adaptation de ce protocole par spectrophotométrie, comme

méthode alternative au glucomètre, permettra d'avoir une procédure permanente pour le dosage du glucose dans le sirop d'érable.

La détermination du taux de glucose dans le sirop d'érable permet de déduire le taux de sucre inverti. Celui-ci a un grand impact sur la qualité et la stabilité de certains produits dérivés du sirop d'érable qui ont tendance à cristalliser si les teneurs recommandées de sucre inverti ne sont pas respectées.

Le terme sucre inverti fait référence au glucose et fructose obtenus après inversion ou hydrolyse enzymatique du saccharose. Cette inversion peut se produire d'une façon naturelle sous l'effet d'enzymes microbiens présents dans la sève d'érable, ou avec l'ajout d'une enzyme d'inversion pour obtenir un sirop avec un taux élevé de sucre inverti (>2%).

Les procédures proposées dans la littérature pour estimer le taux du sucre inverti dans le sirop d'érable considèrent que celui-ci est composé d'un mélange équimolaire de glucose et de fructose et par conséquent que le taux du sucre inverti correspond à deux fois le taux du glucose (*Dumont 1998, CTTA, 2004*). Cette relation entre le taux de glucose et le sucre inverti est valide pour les sirops qui ont subi une inversion.

Par ailleurs, des études sur les teneurs naturelles en sucres dans le sirop d'érable montrent que la teneur en glucose et en fructose n'est pas toujours équivalente (*Stuckel & Low, 1996; Van den Berg et al., 2006; Ball, 2007*). L'utilisation donc du taux de glucose pour déduire le taux de sucre inverti pourrait s'avérer moins fiable dans certains cas. Ainsi, pour évaluer la validité de cette méthode qui consiste à déterminer le taux de sucre inverti à partir de la valeur du taux de glucose, des analyses du glucose et du fructose dans le sirop d'érable ont été réalisées par chromatographie liquide.

OBJECTIFS

- Révision et adaptation de la méthode au glucomètre pour la mesure du taux de glucose dans le sirop d'érable.
- Mise au point d'une méthode alternative par spectrophotométrie pour le dosage du glucose dans le sirop d'érable.
- Élaboration d'une table de conversion du taux de glucose en taux de sucre inverti dans le sirop d'érable

MÉTHODOLOGIE

1- Révision et adaptation de la méthode de mesure du taux de glucose avec le glucomètre

1.a. Sélection et évaluation des glucomètres

Les glucomètres actuellement disponibles sur le marché ont souvent le même principe de mesure. Celui-ci est fondé sur la mesure du courant électrique engendré par la réaction entre le glucose et les réactifs que porte l'électrode de la bandelette d'analyse. L'échantillon est aspiré par l'extrémité de la bandelette par action capillaire. Le glucose présent dans l'échantillon réagit avec une enzyme (ex. *glucose déshydrogénase FAD*) et les électrons qui en résultent produisent un courant électrique proportionnel à la quantité de glucose dans l'échantillon.

Dans cette étude, trois modèles représentant les principaux glucomètres disponibles sur le marché ont été sélectionnés pour être testés avec des échantillons de sirop d'érable. Il s'agit des glucomètres *Accu-Chek Aviva*, *Contour Next* et *One Touch Verio*.

L'évaluation des glucomètres a été effectuée dans un premier temps avec des solutions standards de glucose. Ces solutions ont été préparées avec de l'eau déionisée à une concentration comprise entre 1 et 33 mmol/l.

Pour l'évaluation de la fiabilité de la détermination du glucose dans les produits d'érable avec le glucomètre, des analyses ont été effectuées avec les trois glucomètres sur plusieurs échantillons de sirop d'érable. Ces échantillons ont également été analysés par chromatographie liquide couplée à un détecteur d'indice de réfraction. Cette méthode est considérée comme la méthode de référence pour

le dosage des sucres. Les résultats obtenus avec les différents glucomètres ont été comparés à ceux obtenus par chromatographie liquide.

1.b. Vérification de l'étalonnage et facteur de correction de la lecture du glucomètre

Le glucomètre est un appareil qui est conçu et étalonné pour la mesure du taux de glucose dans le sang. Lorsqu'il est utilisé pour la mesure dans les produits d'érable, le taux de glucose observé pour le même échantillon de sirop peut être différent d'un glucomètre à l'autre. La mise au point d'une procédure de vérification de l'étalonnage est indispensable afin que la mesure avec le glucomètre soit toujours valide même si d'éventuelles modifications seront introduites sur les appareils actuels. Cette procédure permettra de corriger, si nécessaire, les lectures obtenues par le glucomètre et d'assurer l'exactitude des résultats d'analyses.

Pour tenir compte des facteurs qui pourraient influencer la fiabilité de la mesure avec le glucomètre, la vérification de l'étalonnage sera effectuée avec des échantillons de sirop d'érable fortifiés et en respectant le même facteur de dilution qui sera appliqué lors de l'analyse des échantillons. Ainsi, six échantillons de sirop ont été analysés avec les différents glucomètres après dilution de 1 ml de sirop dans 9 ml d'eau. Les mêmes échantillons de sirop (1ml) ont été fortifiés avec 1 ml d'une solution de glucose à 60mmol/l, puis dilués avec 8 ml d'eau. En tenant compte du facteur de dilution, le niveau de fortification des échantillons de sirop est de 6mmol/l. La différence entre la lecture de l'échantillon fortifié et l'échantillon de sirop non fortifié représente la réponse du glucomètre pour la concentration 6mmol/l. Le facteur de correction de la lecture du glucomètre sera déterminé à partir des résultats des échantillons fortifiés et non fortifié selon l'équation suivante :

$$\text{Facteur de correction (Fc)} = (\text{lecture de l'échantillon fortifié} - \text{lecture échantillon non fortifié}) / 6 \text{ mmol/l}$$

2- Mise au point d'une méthode alternative au glucomètre

L'adoption d'une procédure pour vérifier l'étalonnage et corriger la lecture du glucomètre permettra d'améliorer la fiabilité de l'analyse au glucomètre. Toutefois, la vérification de l'étalonnage du glucomètre doit être effectuée chaque fois que le niveau de dilution de l'échantillon est modifié ou avec l'apparition d'un nouveau modèle de bandelette. Des méthodes alternatives par colorimétrie et qui font appel à des réactions enzymatiques spécifiques au glucose peuvent être adaptées pour le dosage du glucose dans le sirop d'érable (*Ferri et al., 2011*). Ces méthodes offrent plusieurs avantages tels que

l'utilisation d'un étalonnage externe (standard de calibration ou étalon de contrôle) pour déterminer la concentration du glucose dans l'échantillon.

La méthode enzymatique utilisant le système glucose oxydase-peroxydase est largement utilisée pour l'analyse des échantillons biologiques. Cette méthode sera testée et évaluée pour le dosage du glucose dans le sirop d'érable par colorimétrie. Selon le principe de cette méthode, le glucose est oxydé par la *glucose oxydase* (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. En présence de la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec le phénol et le 4-aminophenazone pour donner la quinonéimine, un produit coloré qui absorbe à 500nm. L'absorbance de ce produit est proportionnelle au taux du glucose dans l'échantillon.

Il existe plusieurs fournisseurs du kit enzymatique '*glucose oxydase-peroxydase*'. Les procédures d'utilisations de ces kits analytiques ont été développées pour un usage dans des laboratoires d'analyse biomédicale.

Dans cette étude, le kit distribué par les laboratoires Randox a été évalué et la procédure d'utilisation sera adaptée pour application par les acériculteurs qui sont équipés d'un spectrophotomètre. La procédure initiale consiste à prélever, dans une cuvette de 1cm de longueur optique, 20 µl de l'échantillon ou du standard de glucose et d'ajouter 2ml du réactif (Gluc-PAP). La cuvette est fermée avec un bouchon et le mélange est homogénéisé par inversion (5 à 10 fois). La cuvette est laissée au repos à température ambiante pendant 15 à 30 minutes, puis l'absorbance est mesurée à 500nm.

Pour les échantillons de sirop d'érable, la procédure qui sera évaluée consiste à prélever 200µl du sirop dilué au lieu de 20µl prévu dans la procédure initiale. En l'absence de micropipette, ce volume peut être prélevé avec une seringue de 1ml graduée à chaque 100 µl. Pour la validation de cette procédure, plusieurs critères ont été évalués tels que la cinétique de la réaction, la linéarité et le taux de récupération à partir des échantillons de sirop fortifiés. Les résultats obtenus par cette méthode ont également été comparés à ceux déterminés par chromatographie liquide afin d'évaluer l'exactitude de cette méthode.

3- Estimation du taux de sucre inverti

En acériculture, le taux de glucose est utilisé pour estimer le taux de sucre inverti (glucose et fructose) dans le sirop d'érable. Il est considéré que le sucre inverti est composé d'un mélange équimolaire de

glucose et de fructose obtenus après inversion ou hydrolyse enzymatique du saccharose, et par conséquent, le taux du sucre inverti correspond à deux fois le taux de glucose. Dans le cas d'un sirop d'érable qui n'a subi aucune inversion enzymatique ou hydrolyse acide, le rapport entre le sucre inverti et le taux de glucose peut être différent. Pour évaluer ce rapport, des analyses du sucre inverti (glucose et fructose) seront réalisées par chromatographie liquide sur des échantillons de sirop d'érable de différentes classes de couleurs. Ces données permettront de déterminer la relation entre le taux de glucose et le taux du sucre inverti.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Évaluation des différents modèles de glucomètre

1.a. Évaluation avec des solutions standards de glucose

Des mesures du taux de glucose ont été réalisées sur des solutions standards avec les glucomètres *Accu-Chek Aviva*, *Contour Next* et *One Touch Verio*.

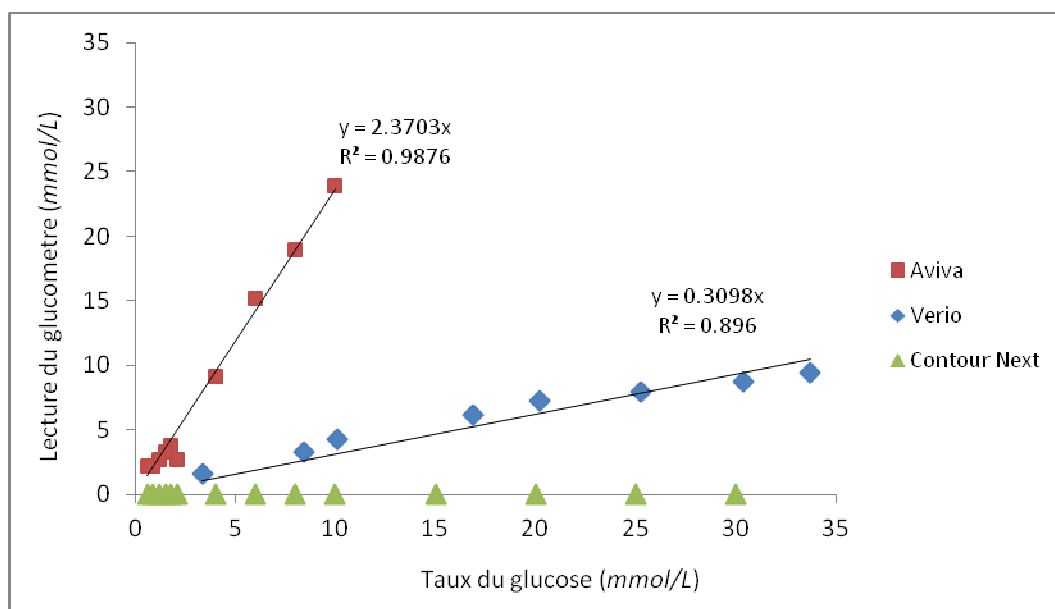


Figure 1. Lecture des solutions standards de glucose avec différents glucomètres

Les résultats de ces mesures montrent que les lectures varient d'un glucomètre à l'autre (Figure 1). Pour *Accu-Chek Aviva*, la lecture obtenue est surévaluée d'environ 2.4 fois par rapport au taux du glucose dans les solutions standards alors que pour *One Touch Verio*, la lecture est sous-estimée au

moins 3 fois. Concernant *Contour Next*, aucune lecture n'était possible avec les solutions standards préparées dans l'eau déionisée.

Ces résultats confirment que même si les glucomètres sont conçus et étalonnés pour la mesure du taux de glucose dans le sang, leur utilisation avec d'autres matrices nécessite un ajustement qui tiendra compte du type de l'échantillon (sirop, concentré ou sève d'érable) et également du facteur de dilution dans le cas des échantillons de sirop d'érable.

1.b. Évaluation des glucomètres par rapport à une méthode de référence (chromatographie)

Des échantillons de sirop d'érable ont été analysés dans un premier temps par chromatographie liquide couplée à un détecteur d'indice de réfraction. Ensuite, les échantillons avec des concentrations de glucose de 0.35 à 0.91% (19 à 51mmol/L) ont été analysés avec les trois modèles de glucomètres. La plage de concentration sélectionnée ($\leq 1\%$) correspond au taux de glucose rencontré pour des échantillons de sirop qui n'ont pas subi d'hydrolyse.

Pour évaluer l'impact du niveau de dilution sur la mesure au glucomètre, les échantillons de sirop ont été divisés en deux séries. Les échantillons avec un taux de glucose inférieur à 0.6% ont été dilués 20 fois et ceux avec un taux supérieur à 0.6% ont été dilués 35 fois avec l'eau déionisée.

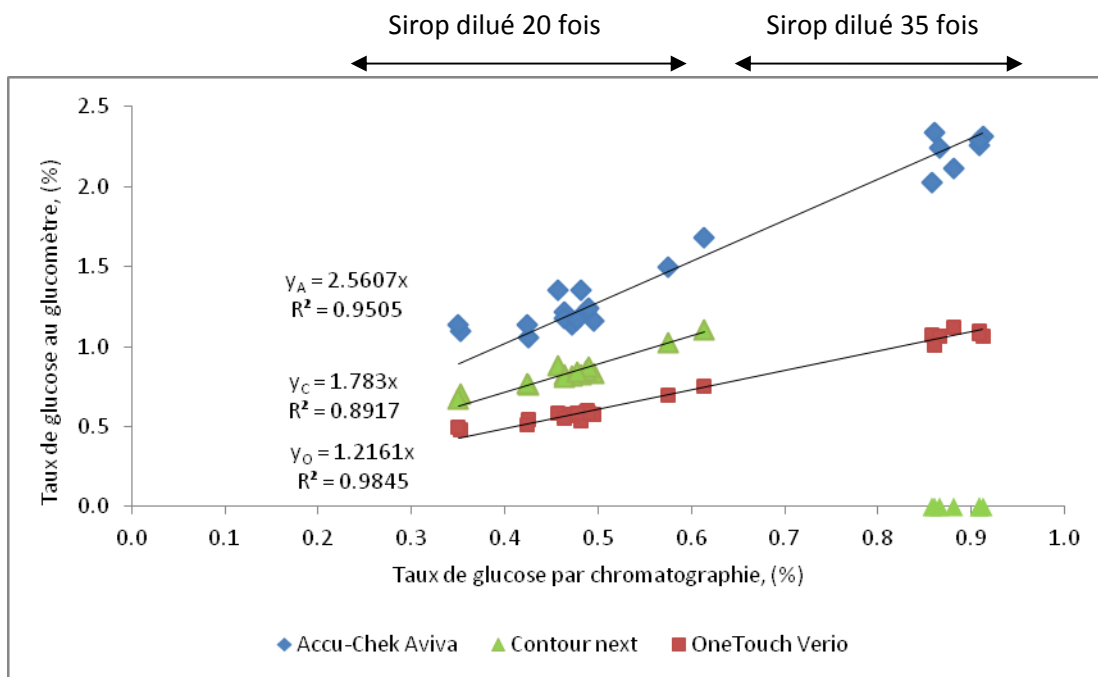


Figure 2. Taux du glucose mesuré au glucomètre et à la chromatographie liquide

Le taux du glucose obtenu par les glucomètres a été comparé au taux obtenu par chromatographie liquide (Figure 2). Pour le glucomètre *Accu-Chek Aviva* et *One Touch Verio*, les lectures du taux de glucose montrent une corrélation acceptable ($R^2 \geq 0.95$) avec le taux déterminé par chromatographie liquide et cette corrélation n'est pas affectée par le facteur de dilution des échantillons de sirop (facteur 20 ou 35). Cependant, les valeurs observées avec *Accu-Chek Aviva* et *One-Touch Verio* sont surestimées avec un facteur 2.5 et 1.2, respectivement.

Pour *Contour Next*, le taux du glucose observé pour les échantillons dilués 20 fois est surestimé avec un facteur 1.8 par rapport au taux mesuré par chromatographie liquide et le facteur de corrélation R^2 entre les données obtenues par *Contour Next* et la chromatographie liquide est de l'ordre de 0.89 (Figure 2). Concernant la série des échantillons dilués 35 fois, aucune lecture n'était possible avec le *Contour Next*.

L'absence de lecture avec certains glucomètres lorsque la dilution des échantillons est élevée peut être due à la diminution de la conductivité électrique de l'échantillon qui se rapprochera de la conductivité de l'eau lorsque le facteur de dilution augmente. Considérant que le fonctionnement des glucomètres actuels est basé sur les principes de l'électrochimie, certaines bandelettes pourraient être sensibles à la conductivité de l'échantillon et une absence de lecture (signal) peut être constatée bien que l'échantillon contient du glucose (ex. bandelette *Contour Next*). Ce phénomène peut être expliqué par la différence dans la composition des bandelettes. En effet, les bandelettes qui sont également appelées biocapteurs à glucose sont classés en trois catégories selon le mode de transfert de l'électron impliqué dans l'oxydation du glucose. Le transfert électronique peut être assuré par le dioxygène (Biocapteur sans médiateur), par un couple redox (Biocapteur avec médiateur) ou par transfert électronique direct ou l'enzyme et l'électrode s'échangent les électrons directement (Wang, 2008).

Les informations concernant la composition et le principe de fonctionnement de chaque modèle de bandelette ne sont pas disponibles au public et sont souvent de nature confidentielle. Ainsi, pour utiliser le glucomètre avec des échantillons de sirop d'érable, il est indispensable de déterminer le facteur de correction de la lecture en utilisant des échantillons fortifiés avec une quantité de glucose connue et en respectant la dilution qui sera appliquée lors des analyses.

1.c. Vérification de l'étalonnage et facteur de correction de la lecture du glucomètre

Pour vérifier l'étalonnage et déterminer le facteur de correction de chaque glucomètre, six échantillons de sirop ont été analysés avec les trois modèles de glucomètres. La première lecture a été effectuée

avec l'échantillon de sirop dilué 10 fois (sirop non fortifié : 1ml de sirop plus 9 ml d'eau) et la deuxième lecture a été effectuée sur l'échantillon de sirop dilué encore 10 fois, mais fortifié avec 6 mmol/l (sirop fortifié : 1 ml de sirop, 1 ml d'une solution de glucose à 60mmol/l, plus 8 ml d'eau), (Tableau 1).

code échantillon	Accu-Chek Aviva		Contour Next		One Touch Verio	
	sirop non fortifié	sirop fortifié	sirop non fortifié	sirop fortifié	sirop non fortifié	sirop fortifié
sirop 1	7.3	20.1	6.1	19.6	3.2	9.1
sirop 2	7.8	21.0	6.7	19.8	3.4	9.2
sirop 3	11.1	25.2	10.5	23.5	4.7	10.2
sirop 4	11.5	26.7	11.5	31.9	4.9	10.7
sirop 5	15.5	28.9	12.9	27.9	6.9	12.0
sirop 6	16.9	31.1	14.8	26.6	7.3	12.2

Tableau 1. Taux du glucose obtenu avec différents glucomètres pour des sirops fortifiés et non fortifiés

Le facteur de correction de la lecture au glucomètre a été déterminé selon la formule suivante :

Facteur de correction (Fc) = (lecture de l'échantillon fortifié – lecture échantillon non fortifié)/6 (mmol/l)

code échantillon	Facteur de correction		
	Accu-Chek Aviva	Contour Next	One Touch Verio
sirop 1	2.13	2.25	0.98
sirop 2	2.20	2.18	0.97
sirop 3	2.35	2.17	0.92
sirop 4	2.53	3.40	0.97
sirop 5	2.23	2.50	0.85
sirop 6	2.37	1.97	0.82
moyenne	2.30	2.41	0.92
Écart-type	0.14	0.51	0.07
Coefficient de variation	6%	21%	8%

Tableau 2. Facteur de correction de la lecture des différents glucomètres

Pour évaluer l'exactitude des mesures au glucomètre, le facteur de correction déterminé pour chaque glucomètre (Tableau 2) a été appliqué aux lectures observées pour les échantillons de sirop non fortifié (Tableau 1). Ensuite, la lecture corrigée (lecture observée/facteur de correction) a été comparée aux résultats obtenus par chromatographie (Figure 3).

En appliquant le facteur de correction approprié, le taux du glucose estimé avec le glucomètre est du même ordre de grandeur que celui déterminé par chromatographie (facteur : 0.98 à 1.19) et le coefficient de corrélation R^2 varie de 0.92 à 0.99. Par conséquent, le glucomètre peut être un outil précis

pour estimer le taux du glucose dans le sirop d'érable à condition d'utiliser le facteur de correction approprié.

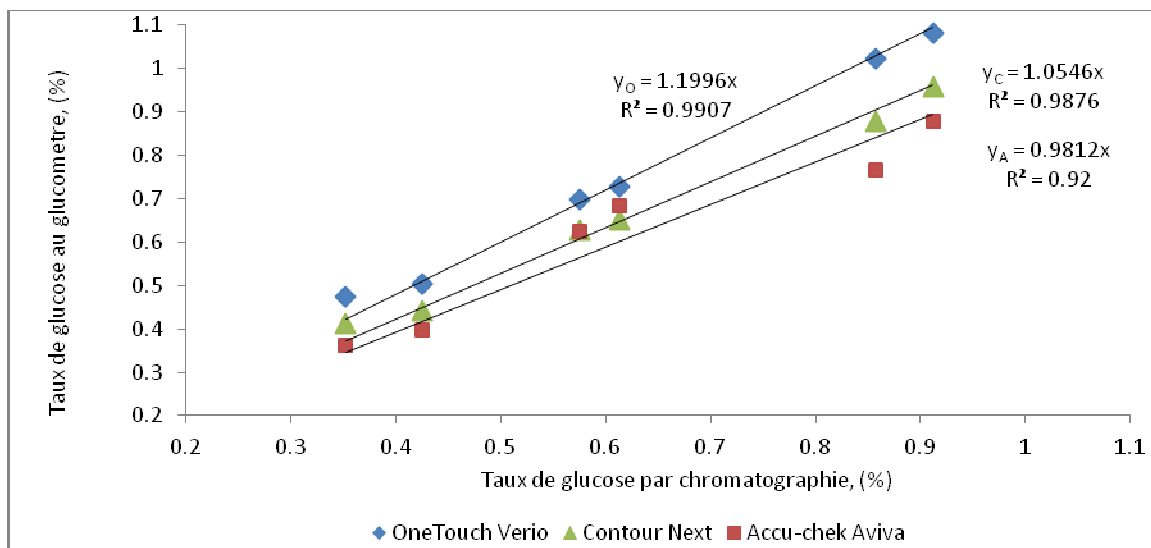


Figure 3. Lecture corrigée du glucomètre versus le taux du glucose par chromatographie.

2- Mise au point d'une méthode alternative par colorimétrie

Plusieurs méthodes colorimétriques ont été rapportées dans la littérature pour le dosage du glucose, toutefois certaines méthodes utilisent des réactifs très acides pour l'oxydation du glucose et pourraient aussi être moins sélectifs (*Willaman and Davison, 1924; Miller, 1959*). La méthode investiguée dans cette étude est la méthode enzymatique (GOD-PAP), appelé aussi méthode de *Trinder* (*Trinder, 1969*). Cette méthode, est principalement utilisée pour le dosage du glucose dans des échantillons biologiques (sérum, plasma et urine). Elle a été adaptée et validée pour le dosage du glucose dans le sirop d'érable.

Performance de la méthode enzymatique

La cinétique de la réaction enzymatique à température ambiante a été étudiée avec des solutions standards de glucose de 0.001 à 0.04%. L'absorbance a été mesurée à 15, 20, 25 et 30min pour chaque mélange de standard (200µl du standard plus 2ml du réactif). La variation de l'absorbance observée entre 15 et 30min pour l'ensemble des standards est restée inférieure à 9% (Figure 4). Concernant la linéarité de la méthode, le coefficient de corrélation R^2 de l'absorbance versus le taux du glucose était supérieur à 0.999 pour les différents temps de réaction (15 à 30min).

Pour le taux de récupération (*CEAEQ, DR-12-VMC*), six échantillons de sirop contenant un taux de glucose d'environ 0.9% ont été dilués 20 fois, puis fortifiés à 0.02% de glucose. L'absorbance des

échantillons a été mesurée 20 minutes après l'ajout du réactif et le taux de récupération observé pour ces échantillons varie de 91.2% à 112.5% avec une moyenne de $103.1\% \pm 8.2$.

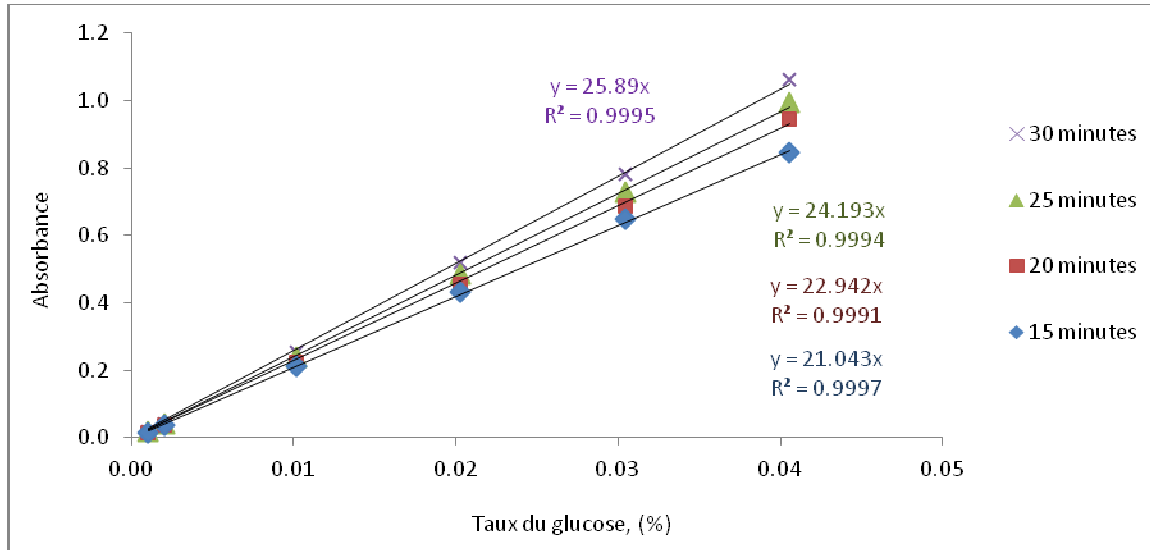


Figure 4 : Linéarité et cinétique de la réaction enzymatique à température ambiante (22.5°C)

Pour l'exactitude, le taux du glucose mesuré par la méthode enzymatique est du même ordre de grandeur que le taux mesuré par chromatographie et le ratio entre les valeurs obtenues avec ces deux méthodes est égal à 0.9768 (Figure 5).

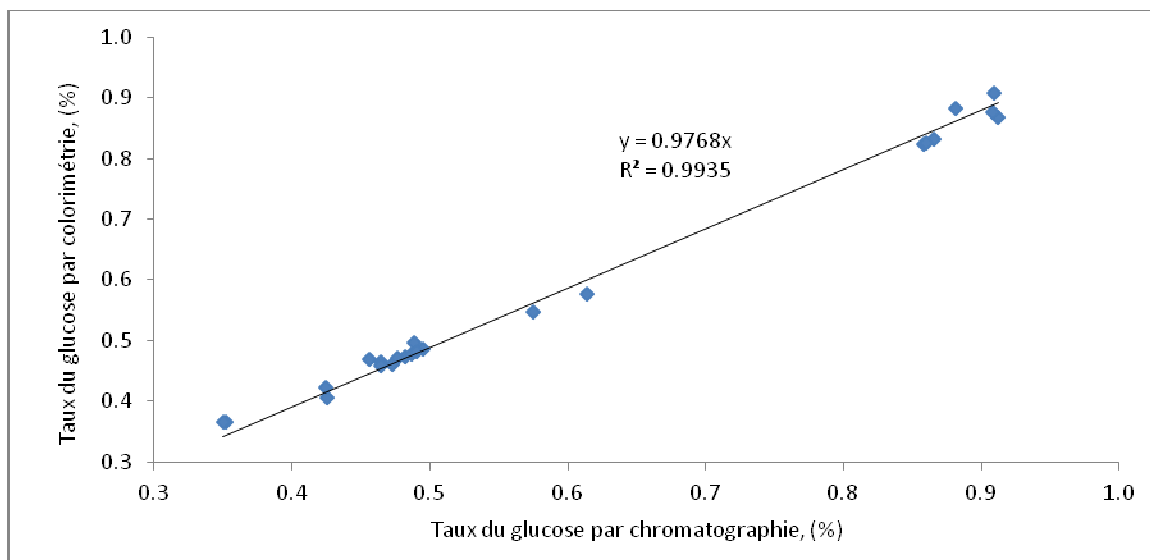


Figure 5. Taux de glucose par colorimétrie (méthode enzymatique) versus chromatographie

Les critères de validation évalués pour la méthode enzymatique confirment ainsi la spécificité de cette méthode et démontrent que celle-ci permet d'obtenir des résultats du taux de glucose comparable à ceux obtenus par chromatographie liquide.

3. Estimation du taux de sucre inverti

En acériculture, le taux du sucre inverti (glucose plus fructose) dans le sirop d'érable est déduit à partir de la valeur du taux du glucose. Pour le sirop qui a subi une hydrolyse acide ou par inversion enzymatique, le sucre inverti est composé d'une proportion égale en glucose et en fructose. Par conséquent, le taux du sucre inverti correspond à deux fois le taux du glucose.

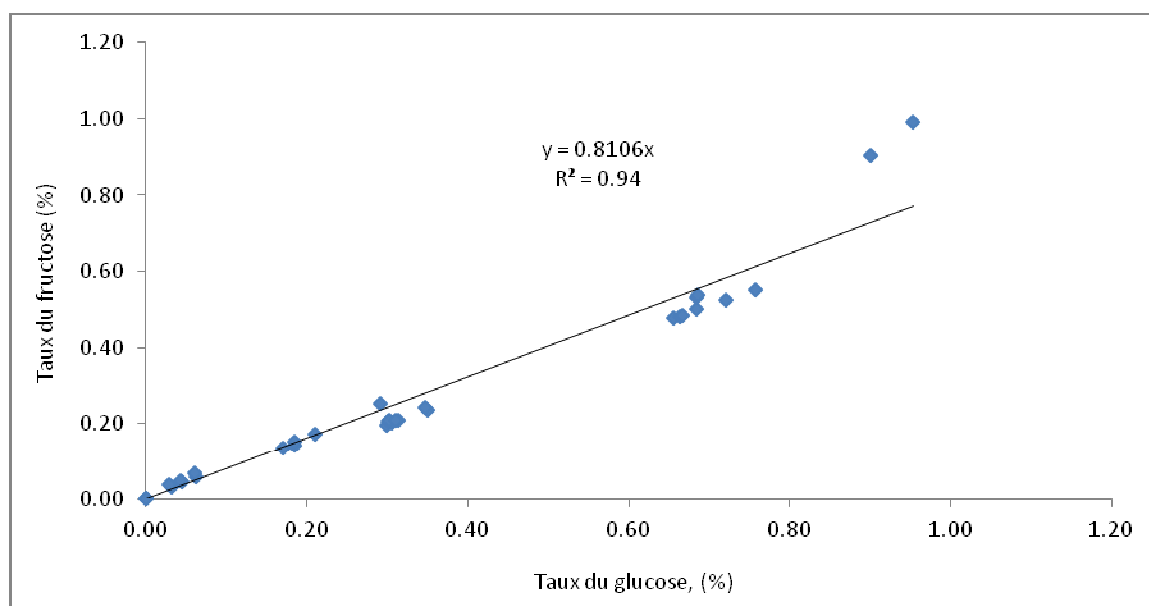


Figure 6. Taux du fructose versus taux du glucose dans des échantillons de sirop d'érable

Pour le sirop d'érable qui n'a pas subi d'hydrolyse ou inversion, le taux du fructose et du glucose ont été déterminés par chromatographie pour 32 échantillons de sirop d'érable qui sont exempts de défauts organoleptiques et couvrent les différentes classes de couleurs (transmittance de 6% à 77%). Le taux du fructose et du glucose obtenus peuvent être considérés du même ordre de grandeur bien que leur ratio est différent de 1 (ratio = 0.81, Figure 6). Le ratio entre le taux du sucre inverti et du glucose a également été calculé à partir de ces données et celui-ci était de l'ordre de 1.82 ± 16 .

Ces résultats montrent que la détermination du taux du sucre inverti à partir du taux du glucose peut être aussi généralisée aux sirops qui n'ont pas subi d'inversion. De même, le taux du sucre inverti

obtenu en multipliant le taux du glucose par 2 donnera une estimation assez précise du taux réel de sucre inverti dans le sirop d'érable.

CONCLUSION

La détermination du taux de glucose dans le sirop d'érable avec les nouveaux glucomètres a été évaluée. Trois modèles de glucomètre ont été investigués et les résultats montrent que la mesure au glucomètre varie d'un modèle à l'autre et que l'exactitude de celle-ci peut être affectée par le facteur de dilution appliqué aux échantillons de sirop. Une procédure pour déterminer le facteur de correction et vérifier l'étalonnage du glucomètre a été mise en place et permettra d'uniformiser les lectures observées par le glucomètre. L'application de cette procédure est indispensable pour continuer à utiliser le glucomètre comme outil de mesure rapide du taux de glucose dans le sirop d'érable. Parmi les glucomètres évalués, le glucomètre Accu-Check Aviva est le seul qui n'est pas affecté par le niveau de dilution (Tableau 3) et pourra donc être recommandé même pour des échantillons de sirop d'érable avec un taux élevé en sucre inverti.

Une autre procédure d'analyse par colorimétrie a été développée en tant qu'alternative à la procédure de mesure au glucomètre. Cette procédure consiste à mesurer l'absorbance de l'échantillon de sirop après ajout d'un réactif contenant la *glucose oxydase* qui est une enzyme spécifique au glucose. La sélectivité de cette enzyme permet d'obtenir des résultats fiables et qui seront du même ordre de grandeur que le taux du glucose déterminé par chromatographie liquide (facteur 0.9768). Autre avantage de cette méthode, les réactifs employés sont plus sécuritaires comparés à d'autres méthodes colorimétriques qui utilisent des réactifs acides pour l'oxydation du glucose.

L'amélioration de la fiabilité de la mesure du taux du glucose assurera certainement une meilleure évaluation du taux du sucre inverti dans le sirop d'érable. En effet, des analyses du taux du glucose et du taux du sucre inverti par chromatographie montrent une corrélation entre ces deux paramètres même pour les sirops d'érable qui n'ont pas subi d'hydrolyse ou inversion enzymatique. Ainsi, le taux du sucre inverti dans le sirop d'érable pourra être estimé à partir du taux du glucose.

BIBLIOGRAPHIE

- ✓ Ball, D. W. 2007. The Chemical Composition of Maple Syrup. *Journal of Chemical Education* 84, 1647-1650.
- ✓ CEAEQ, DR-12-VMC. Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie. Édition : 9 juin 2009.
- ✓ Childs S. and Chabot, B. 2007. Measuring and Adjusting Invert Sugar in Maple Sugar. Cornell Sugar Maple Research & Extension Program, Cornell Maple Bulletin 206.
- ✓ 'CTTA', 2004. Cahier de transfert technologique en acériculture. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire de Québec.
- ✓ Dumont, J. 1998. Technique pour le dosage du sucre inverti dans le sirop d'érable. Info-fiche acéricole No 311-FCH-1098.
- ✓ Dumont, J. 1999. Mise au point d'un outil de mesure rapide permettant d'évaluer la tendance d'une sève à donner un sirop ayant un défaut de goût majeur. Centre ACER, Rapport no 322-Fin-0299.
- ✓ Ferri, S. Kojima, K. and Sode, K. 2011. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A Bird's Eye View of Glucose Sensing Enzymes. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 5, 1068-1076.
- ✓ Laboratoires Randox. [http://www.randoxonlinestore.com/Reagents/Glucose-\(liquid\)-assay-p-8079](http://www.randoxonlinestore.com/Reagents/Glucose-(liquid)-assay-p-8079).
- ✓ Lagacé, L. et Charron, C. 2008. Diagnostic de la qualité de la sève d'érable - utilisation du glucomètre. Info-fiche acéricole No 231A058F.
- ✓ Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 31, 426.
- ✓ Stuckel, J. G. and Low, N. H. 1996. The chemical composition of 80 pure maple syrup samples produced in North America. *Food research International* 29, 373-397.
- ✓ Trinder, P. 1969, *Ann. Clin. Biochem*, 6, p.24-27.
- ✓ Van den Berg, T. Perkins and M. Isselhardt, 2006. SUGAR PROFILES OF MAPLE SYRUP GRADES. *Maple Syrup Digest*, 18A (4).
- ✓ Wang, J., 2008. Electrochemical Glucose Biosensors, *Chem. Rev.* 108, 814-825.
- ✓ Willaman J. J. and Davison, F. R. 1924. Some modification of the picric acid method for sugars. *Journal of Agricultural Research*. Vol XXVIII, No 5.

ANNEXES

Annexe 1

Facteur de correction de la lecture du glucomètre en fonction du niveau de dilution de l'échantillon

Facteur de dilution	Facteur de correction (FC)		
	<i>Accu-Check Aviva</i>	<i>One Touch Verio</i>	<i>Contour Next</i>
10 (réf. Tableau 2)	2.30	0.92	2.41
20 – 35 (réf. Figure 2)	2.56	1.22	1.78 - aucune lecture
100 (réf. Figure 1)	2.37	0.30	aucune lecture
Moyenne	2.41	0.81	-
Écart-Type	0.1	0.5	-
CV%	6%	58%	-

Tableau 3. Facteur de correction de la lecture du glucomètre en fonction du facteur de dilution de l'échantillon

Annexe 2

Procédure de la mesure au glucomètre et détermination du taux du sucre inverti

Dans cette procédure nous recommandons l'utilisation du glucomètre Accu-Chek Aviva puisque la précision de ce modèle n'est pas affectée par le facteur de dilution de l'échantillon. Toutefois, tout modèle équivalent pourra être utilisé à condition d'établir le facteur de correction de la lecture en fonction de la dilution qui sera appliquée aux échantillons.

Matériel nécessaire

- Un glucomètre Accu-check Aviva avec le kit des bandelettes;
- Une seringue de plastique de 10 ml;
- Une seringue de plastique de 1 ml;
- Tubes d'essai de 15 ml en plastique avec bouchon;
- Un compte-gouttes;

Procédure de mesure

1. Vérifier la calibration de l'appareil selon la méthode décrite dans le guide de l'utilisateur du modèle choisi;
2. Mesurer 1 ml du sirop d'érable à doser avec la seringue de 1 ml;
3. Vider le contenu de la seringue dans un tube de 15 ml;
4. Ajouter 9 ml d'eau prélevée avec la seringue de 10 ml et homogénéiser le mélange;
5. Placer le moniteur sur une surface plane et mettez-le en marche;
6. Insérer une bandelette-test dans le moniteur (consulter le guide de l'utilisateur fourni avec l'appareil);
7. À l'aide du compte-gouttes, déposer une goutte du mélange sur la zone réactive de la bandelette;
8. Noter la lecture affichée à l'écran et utiliser la table de conversion (dilution 10) pour lire le taux du sucre inverti. Si la lecture affichée dépasse la limite supérieure de du glucomètre (HI), veuillez suivre l'étape 9;
9. Dans un nouveau tube de 15 ml, prélever 1 ml de l'échantillon préparé dans l'étape 4;
10. Ajouter 9 ml d'eau prélevé avec la seringue de 10 ml et homogénéiser le mélange;
11. Veuillez suivre les étapes 5 à 7;
12. Noter la lecture affichée à l'écran et utiliser la table de conversion (dilution 100) pour lire le taux du sucre inverti. Si la lecture affichée dépasse la limite supérieure de du glucomètre (HI), veuillez suivre l'étape 13;
13. Dans un nouveau tube de 15 ml, prélever 5 ml de l'échantillon préparé dans l'étape 10 et y ajouter 5 ml d'eau avec une seringue propre;
14. Veuillez suivre les étapes 5 à 7;
15. Noter la lecture affichée à l'écran et utiliser la table de conversion (dilution 200) pour lire le taux du sucre d'inverti.

Table de conversion de la lecture du glucomètre Aviva en taux du sucre inverti (%)

Dilution 10 1 ml du sirop + 9 ml eau			Dilution 100 1 ml Dilution 10 + 9 ml eau			Dilution 200 5 ml Dilution 100 + 5 ml eau		
Lecture Aviva	Lecture corrigée*	% sucre inverti	Lecture Aviva	Lecture corrigée*	% sucre inverti	Lecture Aviva	Lecture corrigée*	% sucre inverti
LO	—	<0.07	LO	—	<0.7	LO	—	<1.4
0.6	0.3	0.07	0.6	0.3	0.7	0.6	0.3	1.4
1	0.4	0.11	1	0.4	1.1	1	0.4	2.3
2	0.8	0.23	2	0.8	2.3	2	0.8	4.5
3	1.3	0.34	3	1.3	3.4	3	1.3	6.8
4	1.7	0.45	4	1.7	4.5	4	1.7	9.1
5	2.1	0.57	5	2.1	5.7	5	2.1	11.3
6	2.5	0.68	6	2.5	6.8	6	2.5	13.6
7	2.9	0.79	7	2.9	7.9	7	2.9	15.9
8	3.3	0.91	8	3.3	9.1	8	3.3	18.1
9	3.8	1.02	9	3.8	10.2	9	3.8	20.4
10	4.2	1.13	10	4.2	11.3	10	4.2	22.6
11	4.6	1.25	11	4.6	12.5	11	4.6	24.9
12	5.0	1.36	12	5.0	13.6	12	5.0	27.2
13	5.4	1.47	13	5.4	14.7	13	5.4	29.4
14	5.8	1.59	14	5.8	15.9	14	5.8	31.7
15	6.3	1.70	15	6.3	17.0	15	6.3	34.0
16	6.7	1.81	16	6.7	18.1	16	6.7	36.2
17	7.1	1.92	17	7.1	19.2	17	7.1	38.5
18	7.5	2.04	18	7.5	20.4	18	7.5	40.8
19	7.9	2.15	19	7.9	21.5	19	7.9	43.0
20	8.3	2.26	20	8.3	22.6	20	8.3	45.3
21	8.8	2.38	21	8.8	23.8	21	8.8	47.6
22	9.2	2.49	22	9.2	24.9	22	9.2	49.8
23	9.6	2.60	23	9.6	26.0	23	9.6	52.1
24	10.0	2.72	24	10.0	27.2	24	10.0	54.3
25	10.4	2.83	25	10.4	28.3	25	10.4	56.6
26	10.8	2.94	26	10.8	29.4	26	10.8	58.9
27	11.3	3.06	27	11.3	30.6	27	11.3	61.1
28	11.7	3.17	28	11.7	31.7	28	11.7	63.4
29	12.1	3.28	29	12.1	32.8	29	12.1	65.7
30	12.5	3.40	30	12.5	34.0	30	12.5	67.9
31	12.9	3.51	31	12.9	35.1	31	12.9	70.2
32	13.3	3.62	32	13.3	36.2	32	13.3	72.5
33	13.8	3.74	33	13.8	37.4	33	13.8	74.7
33.3	13.9	3.77	33.3	13.9	37.7	33.3	13.9	75.4
HI	—	>3.77	HI	—	>37.7	HI	—	>75.4

* Lecture corrigée = lecture Aviva/2.4 (facteur de correction)

Annexe 3

Procédure de mesure du taux de glucose par la méthode enzymatique (GOD/PAP)

Principe de la méthode

Le glucose est oxydé par la *glucose oxydase* (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. En présence de la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec le phénol et le 4-aminophenazone pour donner la quinonéimine, un produit coloré qui absorbe à 500nm. L'absorbance de ce produit est proportionnelle au taux du glucose dans l'échantillon.

En l'absence d'un spectrophotomètre qui peut être ajusté à 500nm, la mesure peut être effectuée à 560 nm. Toutefois, la sensibilité à 560 nm diminue d'environ 30% par rapport à la mesure à 500nm.

Matériel nécessaire

- Réactif du glucose (GOD/PAP) liquide prêt à l'emploi (ex : produit # GL2623, *Randox*). Ce réactif est composé de :
 - Tampon de phosphate 50mmol/l, pH 7.0
 - Tampon MOPS 50mmol/l, pH 7.0
 - Phénol 11 mmol/l
 - 4-aminophenazone 0.77 mmol/l
 - Glucose oxydase $\geq 1.5\text{KU/l}$
 - Peroxydase $\geq 1.5\text{KU/l}$
- Standard du glucose à 1g/l (0.1%);
- Cuvettes de 1 cm de chemin optique, pour mesure dans le visible;
- Bouchons pour cuvettes;
- Seringues de plastique de 10 ml;
- Seringues de plastique de 1 ml gradués à 100ul;
- Tubes d'essai, de 50 ml, en plastique avec bouchon;
- Spectrophotomètre visible
- Chronomètre

Procédure de mesure

-Préparation du standard de travail à 0.2g/l (0.02%): dans une cuvette avec bouchon, prélever 100µl du standard à 1g/l et y ajouter 400 µl d'eau. Mettre le bouchon et bien mélanger la solution avant son utilisation.

Note : les prélèvements pour préparation du standard de travail peuvent être effectués avec la seringue graduée à 100 µl l. Toutefois, pour une meilleure précision, l'utilisation d'une micropipette peut être recommandée.

Préparation de l'échantillon de sirop :

La méthode est linéaire jusqu'à un taux de glucose de 0.04%.

Pour les échantillons qui n'ont pas subi d'hydrolyse enzymatique (taux de glucose $\leq 1\%$, sucre inverti $\leq 2\%$), dans un tube de 50 ml, prélever 2ml du sirop et y ajouter 48ml eau avec la seringue de 10 ml. Ainsi, le facteur de dilution de l'échantillon de sirop est de l'ordre de 25.

Si l'échantillon contenait un taux de glucose supérieur à 1%, le facteur de dilution doit être supérieur ou égal au ratio : taux de glucose attendu/0.04%

Mesure de l'absorbance :

- Préparer dans des cuvettes chacun des mélanges suivants :
 - Blanc – Cuvette 1: 200 µl d'eau;
 - Solution Standard- Cuvette 2 : prélever 200 µl de la solution du travail;
 - Échantillon de sirop – Cuvette 3: prélever 200 µl de l'échantillon de sirop dilué;
- Ajouter 2 ml du réactif (GOD-PAP) prêt à l'emploi à chaque cuvette (blanc, standard et échantillon) et déclencher le chronomètre;
- Mettre le bouchon à chaque cuvette et homogénéiser les mélanges par inversion (5 à 10 fois);
- Allumer le spectrophotomètre et fixer la longueur d'onde à 500nm. Cette mesure peut également être effectuée à 560nm si le spectrophotomètre ne peut pas être ajusté à 500nm;
- Choisir le mode lecture en absorbance;
- À 20 min au chronomètre, faire le zéro de l'appareil avec la cuvette du blanc;
- Prendre la lecture du standard et de l'échantillon de sirop;
- Si l'absorbance de l'échantillon est supérieure à 1, l'échantillon de sirop doit être préparé avec une dilution plus élevée

Calcul de du taux de glucose :

$$\text{Taux du glucose} = (A_{\text{échantillon}}/A_{\text{standard}}) * \text{concentration Standard de travail} * Fd$$

A : absorbance

Fd : Facteur de dilution de l'échantillon de sirop volume total (sirop+eau)/volume de sirop

Pour obtenir le taux du sucre inverti, il faut multiplier le taux du glucose par deux.