



HAL
open science

Prédiction de la dégradation de la vitamine C en conditions de traitement thermique : étude en milieu modèle liquide entre 50 et 90 °C

Braulio Gomez Ruiz

► **To cite this version:**

Braulio Gomez Ruiz. Prédiction de la dégradation de la vitamine C en conditions de traitement thermique : étude en milieu modèle liquide entre 50 et 90 °C. Chimie analytique. AgroParisTech, 2016. Français. NNT : 2016AGPT0002 . tel-03001158

HAL Id: tel-03001158

<https://pastel.hal.science/tel-03001158>

Submitted on 12 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°: 2016 AGPT 0002

Doctorat AgroParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Génie des Procédés

présentée et soutenue publiquement par

Braulio GOMEZ RUIZ

le 12 Janvier 2016

Prédiction de la dégradation de la vitamine C en conditions de traitement thermique : étude en milieu modèle liquide entre 50 et 90 °C

Directeurs de thèse : **Catherine BONAZZI et Francis COURTOIS**

Co-encadrement de la thèse : **Stéphanie ROUX**

Jury

M. Philippe BOHUON, Professeur Montpellier SupAgro, UMR Qualisud
Mme Claire DUFOUR, Chargée de recherche/HDR INRA, UMR SQPOV
M. Cédric BRANDAM, Maître de conférences/HDR ENSIACET, LGC
M. Jean-Dominique DAUDIN, Directeur de recherche INRA, UR QuaPA
Mme Catherine BONAZZI, Directrice de recherche INRA, UMR Genial
Mme Stéphanie ROUX, Maître de conférences AgroParisTech, UMR Genial

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Président
Examineur
Invitée

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Mr. Gilles TRYSTAM pour avoir accepté mon profil et m'avoir mis en contact avec Mme Catherine BONAZZI, pour la réalisation de la thèse doctorale à AgroParisTech centre Massy.

Ce travail de thèse a été mené sous la direction de Mme Catherine BONAZZI, Mme Stéphanie ROUX et M. Francis COURTOIS. Leurs connaissances et leur implication ainsi que leurs conseils et leur patience, ont contribué en grande partie à la réalisation de cette thèse. Je tiens à leur adresser tous mes remerciements et toute ma gratitude.

Je remercie Mme Claire DUFOUR, Chargée de recherche/HDR INRA, UMR SQPOV, et M. Philippe BOHOUN, Professeur à Montpellier SupAgro, UMR Qualisud, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie M. Jean-Dominique DAUDIN, Directeur de recherche à l'INRA, et M. Cédric BRANDAM, Maître de conférences/HDR ESIACET, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examineurs.

Je remercie les membres de mon comité de thèse pour leurs conseils et le suivi attentif qu'ils ont porté sur l'évolution de mon travail. Merci à Marie-Elisabeth CUVELIER, Ingénieur de Recherche à AgroParisTech, Jean-Dominique DAUDIN, Jacques NICOLAS, Professeur des Universités à AgroParisTech et Caroline PENICAUD, Chargée de recherche INRA.

Je remercie le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) du Mexique pour le financement de ma thèse.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à l'équipe CALIPRO UMR GENIAL pour m'avoir accueilli au cours de ces quatre années de thèse. Merci à Marie-Elisabeth CUVELIER, Marie-Noëlle MAILLARD, Pierre GIAMPOLI, Bertrand HEYD, Barbara REGA et Hedi ROMDHANA pour leurs conseils, disponibilité, sympathie et encouragements pendant la thèse.

Merci à Nicolas, Julien, Séverine, Paola et Even, techniciens et ingénieurs du laboratoire, pour leur disponibilité et leur assistance tout au long de la thèse.

Merci aux doctorants (Charlène, Josselin, Pierre, Lucie, Christiane, Marine, Cassandre, Gaëlle, Farnaz) et stagiaires pour leur sympathie et les bons moments passés ensemble. Félicitations à ceux qui ont déjà fini et bon courage aux autres. Merci à Yacine pour sa bonne humeur et les matchs de baby-foot.

Quiero agradecer a mis padres, Emilio GOMEZ RABAGO y Raquel RUIZ ESPARZA, por su amor y apoyo incondicional, que estando a kilómetros de distancia siempre estuvieron ahí para apoyarme y darme ánimos en los momentos más difíciles.

Agradezco también a mis hermanos Emilio GOMEZ RUIZ y Rafael GOMEZ RUIZ por su apoyo y palabras de aliento.

Agradezco a mis abuelitas Raquel RABAGO NAVARRETE y Raquel ESPARZA CHAVEZ por sus consejos de vida que ayudaron mucho a superar esta etapa profesional.

Un enorme agradecimiento a mis amigos y compañeros latinos de la tesis (Mayelita, Carlos, Etzael, Marta, Rómulo, Roberto, Rayo, Samira) por apoyarme, escucharme, y aconsejarme en todo momento durante la tesis.

Résumé

La vitamine C est souvent utilisée comme un indicateur de la rétention de nutriments thermolabiles dans les produits transformés en raison de sa grande sensibilité aux conditions de traitement et de conservation. La compréhension du comportement de la vitamine C dans les procédés de transformation des matrices complexes est difficile, du fait de l'importance de plusieurs paramètres qui influent sur sa dégradation (température, pH, exposition à la lumière, présence d'oxygène et d'ions métalliques). L'étude de la réactivité dans un milieu simple, de composition connue, dans des conditions maîtrisées, est indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes et à une modélisation permettant de prédire l'impact des paramètres de procédés sur la teneur résiduelle. Ce travail de recherche contribue à cette ambition pour des températures représentatives d'un procédé de transformation (50 - 90 °C), tout en dissociant l'effet de la concentration en oxygène dissous (entre 0 et 30%). Pour y parvenir, une méthode simple et rapide de quantification des acides ascorbique (AA) et déshydroascorbique (DHAA) a été développée et validée. Elle a permis l'obtention d'une base de données réactionnelles pour différents couples température et concentration en oxygène, en milieu tamponné et parfaitement agité. Deux modèles cinétiques ont été développés : un modèle simple permettant de prédire la dégradation de l'AA et un modèle complexe prenant en considération les deux voies de dégradation oxydative et thermique sur les cinétiques de dégradation de l'AA et du DHAA. Les deux modèles montrent un bon ajustement aux données expérimentales et une forte corrélation entre la vitesse de réaction k_1 de la réaction d'oxydation et le coefficient stœchiométrique β relatif à l'oxygène. Une relation linéaire reliant β à la température a été proposée.

Abstract

Vitamin C is often used as an indicator of labile nutrient retention in processed products because of its sensitivity to processing and conservation conditions. Understanding the behavior of vitamin C in complex matrices transformation processes is difficult, due to the importance of several parameters that affect its degradation (temperature, pH, exposure to light, the presence of oxygen and metal catalysts). Studying reactivity in a simple environment of known composition, under controlled conditions, is necessary for a better understanding of the mechanisms and for modelling in order to predict the impact of process parameters on the residual vitamin content. The present research aims at contributing to this goal for temperatures of a transformation process (50 - 90 °C), while decoupling the effect of concentration of dissolved oxygen (between 0 and 30%). To achieve this, a simple and rapid method of quantification of ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic (DHAA) was first developed and validated. It allowed obtaining a reaction database for different couples of temperature and oxygen concentration, in a buffered and perfectly stirred medium. Two kinetic models were developed: a simple reaction model to predict the degradation of AA, and a more complex model taking into consideration both oxidative and thermal degradation pathways on the degradation kinetics of AA and DHAA. Both models show a good fit to experimental data and a strong correlation between k_1 reaction rate of the oxidation reaction and the stoichiometric coefficient β relative to oxygen. A linear relationship between β and temperature was also proposed.

Liste des communications et publications

1. **Publication 1 :**

Gomez-Ruiz, B., Roux, S., Courtois, F., & Bonazzi, C. (2016). Spectrophometric method for fast quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in simple matrix for kinetics measurements. *Food Chemistry*, (Soumis).

2. **Publication 2 :**

Gomez-Ruiz, B., Roux, S., Courtois, F., & Bonazzi, C. (2016). Degradation kinetics of vitamin C at different temperatures and concentrations of dissolved oxygen in a model solution. Part I. Simple model of ascorbic acid concentration. *Food Chemistry*, (A soumettre).

3. **Publication 3 :**

Roux, S., Gomez-Ruiz, B., Courtois, F., & Bonazzi, C. (2016). Degradation kinetics of vitamin C at different temperatures and concentrations of dissolved oxygen in a model solution. Part II. Multiresponse modeling of ascorbic and dehydroascorbic acids concentrations. *Food Chemistry*, (A soumettre).

4. **Conférence :**

Gomez-Ruiz, B., Roux, S., Courtois, F., & Bonazzi, C. An original approach to study ascorbic acid degradation kinetics as a function of temperature (50-90 °C) and oxygen concentration (0-30%). *ICEF 12*, 14-18 Juin 2015, Québec, Canada.(oral presentation).

Table des Matières

Résumé	
Abstract	
Liste des communications et publications	
Table des Matières	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Nomenclature	
Introduction générale.....	1
1. Synthèse bibliographique	3
1.1 La vitamine C.....	5
1.1.1 Intérêt nutritionnel	5
1.1.2 Origine	6
1.1.3 Constitution chimique.....	7
1.1.4 Propriétés physico-chimiques	9
1.1.5 Méthodes de dosage de la vitamine C	10
1.2 La réactivité de l'acide ascorbique	13
1.2.1 Voies de dégradation anaérobie ou non oxydatives	13
1.2.2 Voies de dégradation aérobie ou oxydatives.....	15
1.2.3 Impact des conditions physico-chimiques sur la réactivité de l'acide ascorbique .	
.....	18
1.2.3.1 Effet du pH	18
1.2.3.2 Effet de la température	20
1.2.3.3 Effet de la présence d'oxygène	22
1.2.3.4 L'effet de l'exposition à la lumière.....	24
1.2.4 Impact des procédés de transformations sur les dégradations de l'acide ascorbique dans les produits alimentaires.....	24

1.3	Modélisation des mécanismes de réaction de l'acide ascorbique en fonction des conditions physico-chimiques.....	27
1.3.1	Modélisation des réactions apparentes à l'échelle de l'aliment.....	28
1.3.2	Modélisation des cinétiques à l'échelle moléculaire	32
1.3.3	Conclusions	34
1.4	Conclusion de l'analyse bibliographique	34
2.	Matériel et méthodes	36
2.1	Méthodes analytiques.....	36
2.1.1	Réactifs.....	36
2.1.2	Préparation des solutions.....	36
2.1.3	Dosage de l'acide ascorbique (AA)	38
2.1.4	Dosage de l'acide déshydroascorbique (DHAA)	40
2.2	Cinétique de dégradation.....	41
2.2.1	Dispositif expérimental.....	41
2.2.2	Performance du dispositif expérimental	43
2.2.3	Protocole expérimental	45
2.2.4	Détermination de la concentration en oxygène dans le réacteur	47
2.2.5	Prise en compte du volume d'eau évaporé au cours des cinétiques	47
2.3	Modèles.....	49
2.3.1	Régressions linéaires.....	49
2.3.2	Modèles cinétiques simples	49
2.3.3	Modèles cinétiques complexes	49
2.3.4	Caractérisation de l'ajustement des modèles.....	50
3.	Résultats et discussion.....	51
3.1	Quantification des acides ascorbique et déshydroascorbique.....	51
3.1.1	Etudes préliminaires	52
3.1.1.1	Détermination du taux de dilution dans l'acide métaphosphorique permettant l'analyse par spectrophotométrie	52

3.1.1.2	Détermination de la longueur d'onde correspondant au pic d'absorbance maximale de l'acide ascorbique	53
3.1.1.3	Conversion complète du DHAA en AA	54
3.1.1.4	Impact de l'ajout des solutions nécessaires à la réduction du DHAA en AA sur le spectre d'absorbances obtenu	55
3.1.2	Validation de la méthode.....	57
3.1.2.1	Introduction	58
3.1.2.2	Materials and methods	62
3.1.2.2.1	Reagents	62
3.1.2.2.2	Equipment	62
3.1.2.2.3	Ascorbic and dehydroascorbic acids determination	62
3.1.2.2.4	Calibration and validation plans	64
3.1.2.2.5	Tools for method validation.....	64
3.1.2.3	Results and discussion.....	67
3.1.2.3.1	Calibration of ascorbic acid concentration from absorbance measured at 243 nm	67
3.1.2.3.2	Validation of the quantification of ascorbic acid.....	68
3.1.2.3.3	Validation of the quantification of dehydroascorbic acid.....	70
3.1.2.4	Conclusion	75
3.1.3	Conclusion	76
3.2	Cinétiques de dégradation de la vitamine C.....	77
3.2.1	Etudes préliminaires	77
3.2.1.1	Effet de la concentration initiale en acide ascorbique	77
3.2.1.2	Effet du pH	78
3.2.2	Dégradation de la vitamine C et modélisation	79
3.2.2.1	Modélisation simple des concentrations en acide ascorbique.....	80
3.2.2.1.1	Introduction.....	81
3.2.2.1.2	Materials and methods.....	83

3.2.2.1.3	Results and discussion	87
3.2.2.1.4	Conclusion.....	95
3.2.2.1.5	Acknowledgements.....	95
3.2.2.2	Modélisation multi-réponse des concentrations en acides ascorbique et déshydroascorbique	96
3.2.2.2.1	Introduction.....	97
3.2.2.2.2	Material and Methods	99
3.2.2.2.3	Results and Discussion.....	102
3.2.2.2.4	Conclusion.....	112
3.2.2.2.5	Acknowledgements.....	113
4.	Synthèse	112
5.	Conclusion et perspectives.....	116
6.	Références bibliographiques	117
	ANNEXE 1 : Tableau de Winkler	125
	ANNEXE 2 : Outils pour la validation des méthodes.....	126

Liste des Figures

Figure 1. Comparative contents of ascorbic acid in the studied samples (Park et al., 2015).	7
Figure 2. Molécule d'acide ascorbique et d'acide déshydroascorbique.....	8
Figure 3. Structures des stéréo-isomères de l'acide ascorbique.....	8
Figure 4. Dissociation de l'acide ascorbique au pK _a de 4,17.....	9
Figure 5. Formule chimique du dithiothréitol	12
Figure 6. Voie de dégradation non oxydative de l'AA proposée par Kurata & Sakurai, (1967).	14
Figure 7. Réaction de dégradation irréversible du DHAA en acide dicétogulonique.....	15
Figure 8. Equilibres acido-basiques, d'oxydation et d'hydratation associés à l'AA et au DHAA (Bradshaw et al., 2011).....	16
Figure 9. Mécanisme de dégradation oxydative de l'acide ascorbique (Yuan & Chen, 1998).	17
Figure 10. Effet du pH sur la formation des produits de dégradation de l'AA après 2 h de chauffage à 100 °C (Yuan & Chen, 1998).....	20
Figure 11. Influence de la concentration en oxygène dissous sur les vitesses de dégradation de l'AA en milieu aqueux à 20 °C (Penicaud et al., 2009).	23
Figure 12. Influence de la teneur en oxygène dissous sur la vitesse de dégradation de l'AA dans un jus de citron à 90 °C (Dhuique-Mayer et al., 2007).	23
Figure 13. Surfaces de réponse indiquant les l'influence des variables significatives intrinsèque et de procédé sur la teneur résiduelle en AA et le pourcentage de perte (Gabriel et al., 2015).	25
Figure 14. Gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique sur 4 séries de 5 concentrations répétées 3 fois (moyenne et écart-type sur chaque concentration de chaque série).	39
Figure 15. Dispositif expérimental.....	42
Figure 16. Maintien de la température pendant les cinétiques de dégradation (<i>n</i> = 3).	44

Figure 17. Spectre d'absorbance de l'acide ascorbique en fonction de la longueur d'onde pour une solution à 6,81 mM dans un tampon malate (20 mM, pH 3,8) diluée selon différents ratios par de l'acide métaphosphorique à 3%.....	53
Figure 18. Absorbance de solutions d'acide ascorbique à différentes concentrations en fonction de la longueur d'onde.....	54
Figure 19. Balayage spectral des solutions présentes dans le dosage du DHAA, mesurées de manière séparé.....	57
Figure 20. Absorbance spectra recorded on AA (—) and DHAA converted into AA (- -) solutions prepared in 20 mM malate buffer diluted at 1/50 in a 3% metaphosphoric acid solution (w/v).	63
Figure 21. Calibration curve for ascorbic acid quantification using absorbance measured at 243 nm	68
Figure 22. Correction of DHAA content values as a function of the total concentration in AA + DHAA	72
Figure 23. Regression linear model for predicting the intercept value as a function of total absorbance at 243 nm recorded after reduction by DTT.	73
Figure 24. Effet de l'augmentation de la concentration initiale en AA sur la cinétique de dégradation à 70 °C et 21% O ₂	78
Figure 25. Effet du pH sur la dégradation de l'AA à 70 °C et 21% d'O ₂	79
Figure 26. Kinetics of ascorbic acid degradation for 6 temperatures and 3 partial pressures of oxygen.....	88
Figure 27. Kinetic models (—) (Eq. (36)) and experimental data (mean and standard deviation, $n = 3$) for 6 temperatures at 3 partial pressures of oxygen of standardized ascorbic acid concentrations.....	91
Figure 28. Kinetic rate constants (k_{app}) as a function of dissolved oxygen concentrations for 6 temperatures	92
Figure 29. Evolution of the difference between experimental data and model described by equation 34.....	94

Figure 30. Selected reaction pathways for ascorbic acid degradation.....	103
Figure 31. Kinetics of dehydroascorbic acid formation and degradation in a solution initially containing about 5.6 mM of ascorbic acid for 6 temperature and 3 partial pressures of oxygen.....	104
Figure 32. Modeling of standardized ascorbic and dehydroascorbic acids behavior in solutions initially containing about 5.6 mM of ascorbic acid.....	106
Figure 33. Modeling of standardized dehydroascorbic and ascorbic acids behavior in solutions initially containing about 5.6 mM of dehydroascorbic acid for 3 temperatures at 0% of oxygen.....	107
Figure 34. Change in the sum of the squares between modelled and experimental data induced by a variation of one kinetic parameter relatively to the reference	111

Liste des Tableaux

Tableau 1. Teneurs en vitamine C de différents aliments (extrait de la base de données Food Nutrient Database de l'USDA (United States Dept. of Agriculture) (http://ndb.nal.usda.gov/)).	6
Tableau 2. Principales propriétés physico-chimiques de l'acide ascorbique (d'après Davey et al., 2000).	9
Tableau 3. Caractéristiques des principaux modèles cinétiques apparents.	28
Tableau 4. Constantes de vitesse de réaction de l'AA et du DHAA calculées par Serpen & Gokmen, (2007), pour différentes conditions d'oxydo-réduction, en solution à 90 °C...	30
Tableau 5. Conditions de températures et teneurs en oxygène utilisées pour réaliser les cinétiques de dégradation de l'AA. Les chiffres indiquent le nombre de répétitions réalisées.	46
Tableau 6. Effet de différents paramètres de la méthode sur le taux de conversion du DHAA en AA	55
Tableau 7. Calibration and validation plans used for the quantification of AA and DHAA contents.	64
Tableau 8. Statistical results to assess the adequacy of the linear regression model for the calibration curve	68
Tableau 9. Measured and predicted values for the validation of AA content analysis.	69
Tableau 10. Values calculated for evaluating the precision of ascorbic acid analysis.	70
Tableau 11. Experimental measured data and predicted values for the validation of DHAA content analysis.	74
Tableau 12. Values calculated for evaluating the precision of dehydroascorbic acid analysis	75
Tableau 13. First order kinetic modeling (Eq. 36) of ascorbic acid degradation.	89
Tableau 14. Parameters value and adjustment of the complete multiresponse model of AA and DHAA kinetics.	109

Nomenclature

Abréviations

<i>AA</i>	Acide ascorbique
<i>AMP</i>	Acide métaphosphorique
<i>CV</i>	Coefficient de variation
<i>DCPIP</i>	Dichloro-2,6 phénolindophénol
<i>DHAA</i>	Acide déshydroascorbique
<i>DNPH</i>	Dinitro-2,4 phénylhydrazine
<i>DTT</i>	Dithiothreitol
<i>EQRM</i>	Erreur quadratique moyenne relative
<i>HPLC</i>	High pressure liquid chromatography
<i>KGA</i>	Acide 2,3-dicétogulonique
<i>LC-MS</i>	Liquid chromatography – mass spectrometry
<i>LD</i>	Limite de détection
<i>LQ</i>	Limite de quantification
<i>LOD</i>	Limit of detection
<i>LOQ</i>	Limit of quantification
<i>MPA</i>	Metaphosphoric acid
<i>P</i>	Produit de la réaction
<i>PP</i>	Partial pressure
<i>RMSE</i>	Root mean square error
<i>SCE</i>	Somme des carrés des écarts
<i>SS</i>	Sum of square

Symboles

<i>A</i>	Absorbance
<i>a₀</i>	Blanc (ordonnée à l'origine)
<i>a₁</i>	Sensibilité du modèle (pente)
<i>C</i>	Concentration (g L ⁻¹)
<i>E_a</i>	Energie d'activation (kJ mol ⁻¹)
<i>F_{0,01,1,N-p}</i>	Valeur de la table de Fisher pour la linéarité
<i>F_{0,01,p-2,N-p}</i>	Valeur de la table de Fisher pour la non linéarité
<i>F_l</i>	Valeur de Fisher calculée pour la linéarité
<i>F_{nl}</i>	Valeur de Fisher pour calculer la non linéarité

k	Constante de vitesse de réaction
k_{app}	Constante de vitesse de réaction apparente
k_0	Facteur pré-exponentiel de la loi d'Arrhenius
H	Constante de Henry ($\text{g L}^{-1}\text{Pa}^{-1}$)
Int	Intercept
M	Masse molaire (g mol^{-1})
m	Masse (g) ou pente de la droite de régression
N	Nombre total de mesures
n	Nombre de répétitions
p	Nombre de niveaux
P_{atm}	Pression atmosphérique (Pa)
P_{O_2}	Pression partielle d'oxygène (Pa)
r	Vitesse de réaction
s	Ecart type
t	Temps (s)
T	Température ($^{\circ}\text{C}$)
T_{ref}	Température de référence ($^{\circ}\text{C}$)
X	Concentration molaire (mM)
x_{ij}	Mesure de référence dans la série « i » et la répétition « j »
y_{ij}	Mesure de réponse dans la série « i » et la répétition « j »
V	Volume (L)
α	Ordre de réaction pour l'acide ascorbique
β	Ordre de réaction pour l'oxygène
ρ_{H_2O}	Densité de l'eau
$[\text{O}_2]$	Concentration molaire en oxygène dans l'eau (mol/L)

Introduction générale

Introduction générale

La préservation de la qualité nutritionnelle des produits lors des procédés de transformation est essentielle pour les industries agroalimentaires. La vitamine C, présente principalement dans les fruits et légumes, est couramment utilisée comme un marqueur de la valeur nutritive de ce type d'aliments. En effet, sa grande sensibilité à différents paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, la lumière, la présence d'oxygène, d'enzymes et de catalyseurs en font un témoin privilégié de l'intensité des dégradations qui ont pu affecter le produit au cours de sa transformation.

La dégradation de la vitamine C paraît être très documentée. Cependant, la plupart des études en matrice simple ont été faites en conditions de stockage (5 à 45 °C) alors que les études en milieux complexes de type aliment se concentrent plutôt sur une gamme entre 50 et 90 °C. Ainsi, le mécanisme réactionnel de dégradation de la vitamine C, qui ne peut être étudié en matrice réelle du fait du très grand nombre de voies réactionnelles actives lorsque toutes les familles de substrats sont rassemblées, est peu documenté pour la gamme de températures représentatives des procédés de fabrication. Par contre, les études en milieux simples qui pourraient apporter des éclaircissements sur la chimie des réactions sont peu transposables puisque réalisées à une température beaucoup plus basse.

Dans ce contexte, l'objectif central de ce travail est de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de dégradation de la vitamine C pour des températures et des concentrations en oxygène dissous représentatives d'un procédé de transformation. Pour mener à bien ce travail, la 1^{ère} étape a consisté à valider la méthode de dosage choisie, une méthode spectrophotométrique simple et rapide visant à permettre une obtention quasi en temps réel des concentrations en acides ascorbiques (AA) et déshydroascorbique (DHAA) au cours de la réalisation des cinétiques. Ensuite, grâce à cette méthode de quantification, des données de dégradation de la vitamine C (AA et DHAA) pour différents

couples température et concentration en oxygène ont pu être acquises. Finalement une proposition de mécanismes de dégradation de la vitamine C a été faite basée sur la littérature et la modélisation des données expérimentales.

Ce mémoire de thèse est divisé en 3 parties principales : tout d'abord, une étude bibliographique permettant d'identifier les principaux travaux sur l'effet de la température et la concentration en oxygène dissous sur la dégradation de la vitamine C ; ensuite, une partie matériel et méthodes recensant les produits utilisés, la méthode d'analyse et les spécificités du réacteur utilisé pour les traitements thermiques ; enfin, la troisième partie de résultats et discussion. Cette partie présentera les 3 articles qui ont été rédigés et sont actuellement en cours de soumission à la revue *Food Chemistry* et sera conclue par une synthèse des principaux résultats. Finalement, la conclusion de ce mémoire mettra en exergue les résultats marquants de ce travail de thèse, et les perspectives de recherches possibles.

Synthèse bibliographique

1. Synthèse bibliographique

La consommation des aliments évolue et les consommateurs recherchent de plus en plus des produits sains et si possible naturels pour avoir un régime alimentaire nutritionnellement équilibré. Dans ce contexte, les consommateurs sont notamment largement incités à augmenter leur consommation quotidienne de fruits et de légumes, du fait de leur faible apport calorique et car la valeur nutritive de ces produits en fibres et micronutriments (vitamines, minéraux, composés phénoliques) est largement établie (Amiot-Carlin et al., 2007; Barrett & Lloyd, 2012; Domínguez-Perles, Mena, García-Viguera, & Moreno, 2013; Patil, Jayaprakasha, Murthy, & Vikram, 2009; Poiroux-Gonord et al., 2010; Rickman, Barrett, & Bruhn, 2007; Shashirekha, Mallikarjuna, & Rajarathnam, 2015). Ces incitations se traduisent par des campagnes comme "5 A Day for Better Health" du NCI (National Cancer Institute) aux Etats-Unis ou « Manger 5 fruits et légumes par jour » du PNNS (Programme national nutrition santé) en France ou par les recommandations de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) de consommer 400 g/jour de fruits et légumes. Cependant la teneur en eau de la plupart des fruits et des légumes est supérieure à 80%, ce qui limite leur durée de conservation et les rend plus sensibles aux conditions de stockage et de transport. Il est par ailleurs important de noter que les teneurs en certains nutriments comme la vitamine C chutent rapidement après récolte. La production d'aliments transformés permet une consommation tout au long de l'année et des apports nutritionnels garantis, sous réserve de la préservation des teneurs en micronutriments, qui elles-mêmes varient beaucoup selon la variété, les conditions agronomiques de production et l'état de maturité (Barrett & Lloyd, 2012; Kalt, 2005; Leong & Oey, 2012; Poiroux-Gonord et al., 2010). L'évolution des modes de vie privilégiant l'économie de temps a également largement stimulé la demande de fruits et légumes transformés. Parmi ceux-ci, les fruits et les légumes déshydratés attirent l'attention car ils peuvent être facilement produits, stockés et transportés à un coût relativement bas et leur faible teneur en eau évite le développement des micro-organismes responsables de la détérioration des aliments frais. Par contre, les conditions

opératoires appliquées peuvent provoquer une accélération de la dégradation, enzymatique, thermique et/ou oxydative, des vitamines et des nutriments (Devahastin & Niamnuy, 2010; Devic, 2010; Leong & Oey, 2012; López et al., 2010; Santos, & Telis, 2008a; Santos & Silva, 2008). L'impact d'autres procédés tels que la réfrigération ou la surgélation sur la conservation des nutriments a également été étudié (Barrett & Lloyd, 2012; Rickman et al., 2007). Par ailleurs, les interactions des micronutriments entre eux et avec la matrice végétale sont encore mal connus (Amiot-Carlin et al., 2007). La vitamine C peut également être ajoutée comme antioxydant dans les aliments à base de fruits, soit à des fins de fortification, soit pour protéger d'autres nutriments présents de l'oxydation (éviter le brunissement enzymatique des composés phénoliques notamment). Mais c'est un composé instable, facilement oxydable. Elle est très sensible à plusieurs paramètres comme le pH (Rogers & Yacomeni, 1971; Wilson, Beezer, & Mitchell, 1995), la température (Burdurlu, Koca, & Karadeniz, 2006; Laing, Schlueter, & Labuza, 1978; Lin & Agalloco, 1979; Oey, Verlindé, Hendrickx, & Loey, 2006; Rojas & Gerschenson, 1997a, 2001; Yuan & Chen, 1998) et la lumière (Solomon & Svanberg, 1995), ainsi qu'à la présence d'oxygène (Garcia-Torres, Ponagandla, Rouseff, Goodrich-Schneider, & Reyes-De-Corcuera, 2009; Solomon & Svanberg, 1995; Van Bree et al., 2012) et de catalyseurs métalliques (Serpen & Gokmen, 2007).

La vitamine C est souvent utilisée comme indicateur de la rétention des nutriments dans les produits transformés en raison de sa grande sensibilité aux conditions de traitement et de conservation (sensibilité à l'oxydation et au lessivage en milieu aqueux) (Rickman et al., 2007; Rojas & Gerschenson, 1997a). Par ailleurs, il est important de souligner qu'elle existe sous deux formes chimiques : l'acide *L*-ascorbique (la forme réduite) (AA) et l'acide déshydroascorbique (la forme oxydée) (DHAA), qui ont une même activité vitaminique (Institute-of-Medicine, 2000). Il est important de doser les deux formes pour évaluer la teneur en vitamine C d'un produit (Barrett & Lloyd, 2012).

1.1 La vitamine C

1.1.1 Intérêt nutritionnel

La vitamine C est une substance essentielle pour l'Homme, qui ne peut pas être synthétisée par l'organisme et qui doit donc être fournie par l'alimentation. La vitamine C a de nombreuses fonctions biologiques bien établies, indispensables au métabolisme enzymatique et au fonctionnement cellulaire. Un déficit en vitamine C ralentit l'activité d'un certain nombre de systèmes enzymatiques impliqués dans la synthèse du collagène et provoque le scorbut (Institute-of-Medicine, 2000; Patil et al., 2009; Shashirekha et al., 2015). La vitamine C joue également un rôle antioxydant largement reconnu dans la prévention de certains cancers (Frei, Birlouez-Aragon, & Lykkesfeldt, 2012; Patil et al., 2009), en renforçant les fonctions immunitaires et en neutralisant les radicaux libres à l'échelle cellulaire (Sarkar, Srivastava, & Dubey, 2009), et des maladies cardiovasculaires, en réduisant l'athérosclérose (Davey et al., 2000; Frei et al., 2012; Landete, 2013; Sarkar et al., 2009). Il a également été observé que des apports en antioxydants (vitamines C et E notamment) à doses pharmacologiques paraissent liés à une diminution du risque de la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge) ou de cataracte (Amiot-Carlin et al., 2007; Frei et al., 2012). Quelques synthèses récentes sur les effets cliniques constatés de la vitamine C peuvent être mentionnées (Frei et al., 2012; Landete, 2013; Shashirekha et al., 2015).

Les apports nutritionnels conseillés en vitamine C sont de 90 mg/jour pour un homme adulte et de 75 mg/jour pour une femme (Institute-of-Medicine, 2000) : ces valeurs correspondent aux quantités suffisantes pour apporter 97 à 98% des nutriments nécessaires à un individu en bonne santé. Ces valeurs sont à moduler en fonctions des catégories de population (fumeurs, femmes enceintes ou allaitantes, enfants, sportifs...) et de nombreuses études rapportées par (Frei et al., 2012) permettent de penser qu'un apport quotidien de 200 mg de vitamine C permettrait de maximiser le bénéfice santé potentiel pour la majorité de la population adulte. Une absorption jusqu'à 3 g/jour est sans risque de toxicité pour l'organisme.

1.1.2 Origine

La vitamine C est apportée principalement par les fruits et les légumes, notamment les agrumes (Liu, Heying, & Tanumihardjo, 2012), melons, kiwis, mangues, ananas, baies rouges (Szajdek & Borowska, 2008) et les tomates, poivrons, pomme de terre, choux et brocolis (Amiot-Carlin et al., 2007; Domínguez-Perles et al., 2013). Quelques exemples de teneurs en vitamine C dans certains produits sont donnés dans le **Tableau 1** et la **Figure 1**.

Tableau 1. Teneurs en vitamine C de différents aliments (extrait de la base de données Food Nutrient Database de l'USDA (United States Dept. of Agriculture) (<http://ndb.nal.usda.gov/>)).

Product	Vitamin C, total ascorbic acid (mg/100 g)
Peppers, sweet, green, freeze-dried	1 900
Orange drink, breakfast type, with juice and pulp, frozen concentrate	190
Currants, european black, raw	181
Orange peel, raw	136
Kale, raw	120
Grapefruit juice, white, frozen concentrate, unsweetened, undiluted	120
Snacks, potato chips, made from dried potatoes, fat-free, made with olestra	109
Kiwifruit, green, raw	92
Cauliflower, green, raw	88
Dill weed, fresh	85
Brussels sprouts, raw	85
Potatoes, mashed, dehydrated, flakes without milk, dry form	81
Onions, dehydrated flakes	75
Litchis, raw	72
Oranges, raw, with peel	71
Tomato juice, canned	70
Papayas, raw	61
Peas, edible-podded, raw	60
Broccoli, frozen, chopped, unprepared	56
Oranges, raw, California, valencias	49
Nuts, chestnuts, european, raw, unpeeled	43
Amaranth leaves, cooked, boiled, drained, without salt	41
Currants, red and white, raw	41
Broccoli, frozen, chopped, cooked, boiled, drained, without salt	40
Peas, green, raw	40

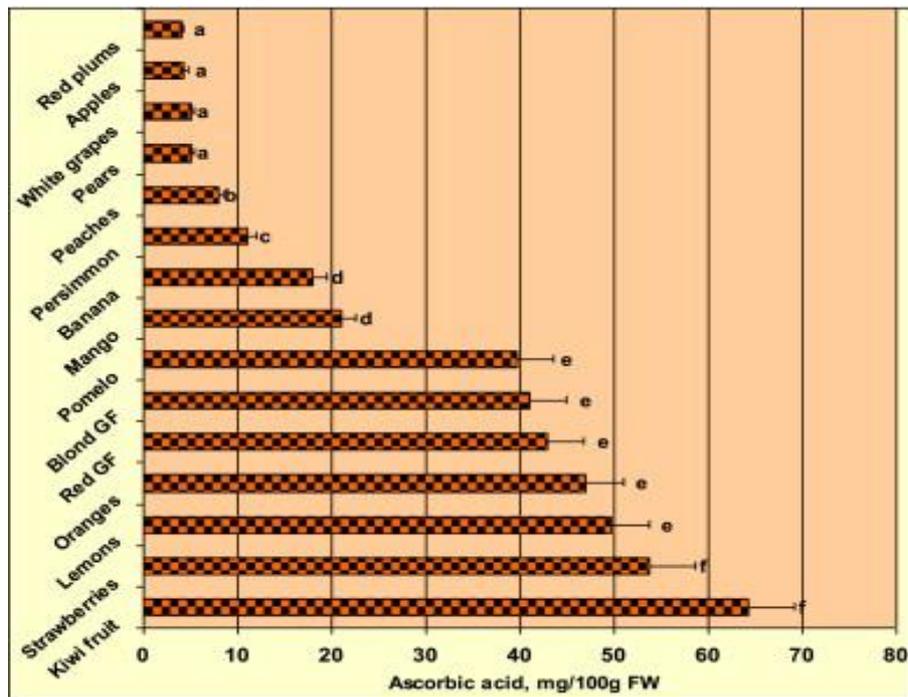


Figure 1. Comparative contents of ascorbic acid in the studied samples. Means \pm SD (horizontal lines), $n = 5$ samples per fruit, each sub-sampled and analyzed 5 times. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). (Park et al., 2015).

1.1.3 Constitution chimique

L'acide ascorbique, ou 2-(1,2-dihydroxyéthyl)-4,5-dihydroxyfuran-2-one, et l'acide déshydroascorbique, (5R)-5-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]furan-2,3,4(5H)-trione, sont des sucres en C6 (formule brute $C_6H_8O_6$ et $C_6H_6O_6$, respectivement) et des acides organiques constitués par un hétérocycle avec un atome d'oxygène et quatre atomes de carbone. La molécule d'acide ascorbique possède 2 carbones asymétriques et est stabilisée par la conjugaison entre les groupements carbonyle et énediol (**Figure 2**).

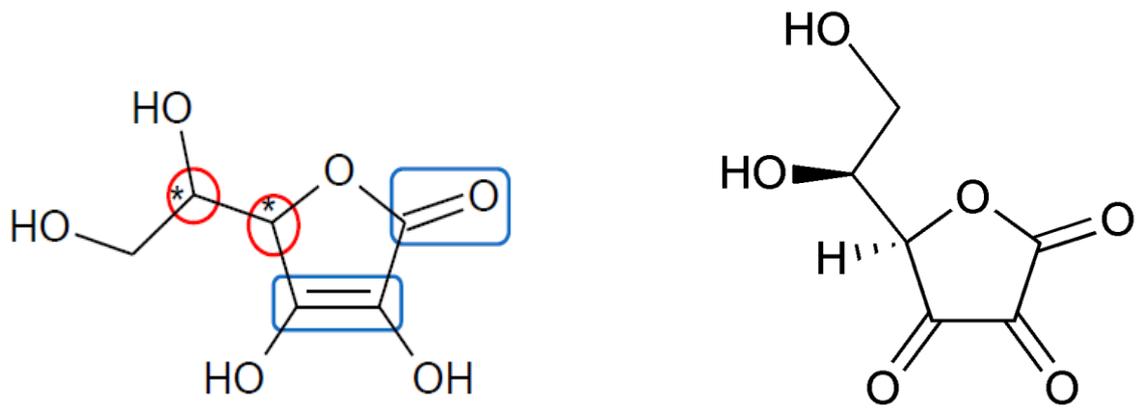


Figure 2. Molécule d'acide ascorbique (à gauche) et d'acide déshydroascorbique (à droite).

L'acide ascorbique possède 4 stéréo-isomères (**Figure 3**), mais seul l'acide *L*-ascorbique possède des propriétés vitaminiques.

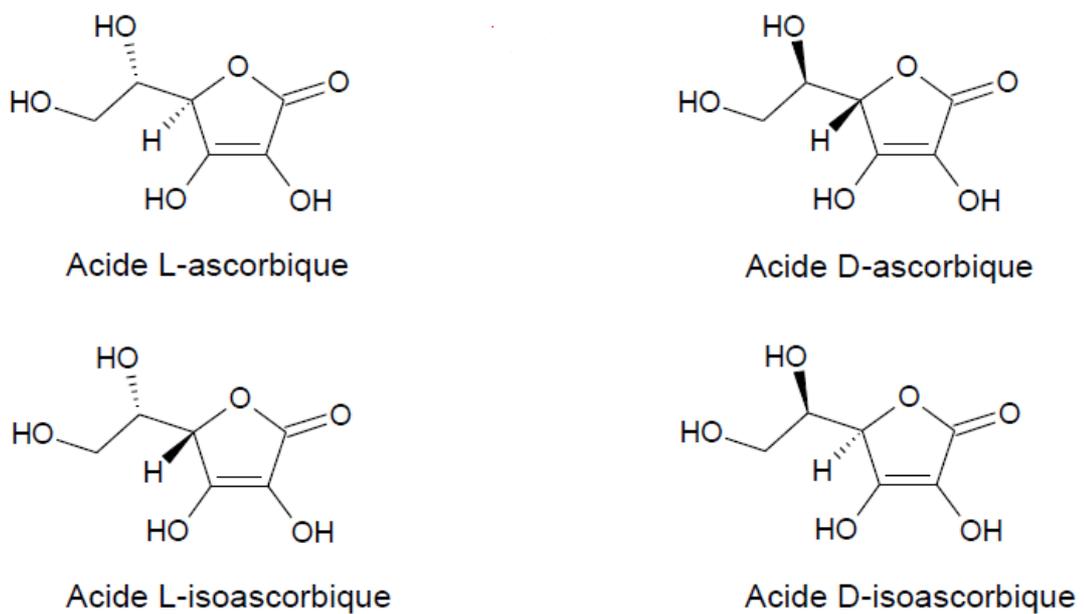


Figure 3. Structures des stéréo-isomères de l'acide ascorbique.

1.1.4 Propriétés physico-chimiques

A température ambiante et à pression atmosphérique, l'acide ascorbique se présente sous la forme d'un solide blanc cristallisé inodore, au goût acide, dont les propriétés physico-chimiques sont données dans le **Tableau 2**. L'acide déshydroascorbique quant à lui, se présente sous forme d'une poudre beige.

Tableau 2. Principales propriétés physico-chimiques de l'acide ascorbique (d'après Davey et al., 2000).

Propriété	Valeur
Masse molaire (g/mol)	176,13
Masse volumique (g/mL)	1,65
Solubilité dans l'eau à 25 °C (g/L)	330
pH	3 (5 mg/mL) ; 2 (50 mg/mL)
pK ₁ à 25 °C	4,17
pK ₂ à 25 °C	11,57

Dans les fruits (pH acide), l'acide ascorbique existe sous la forme d'acide et d'ion ascorbate (**Figure 4**).

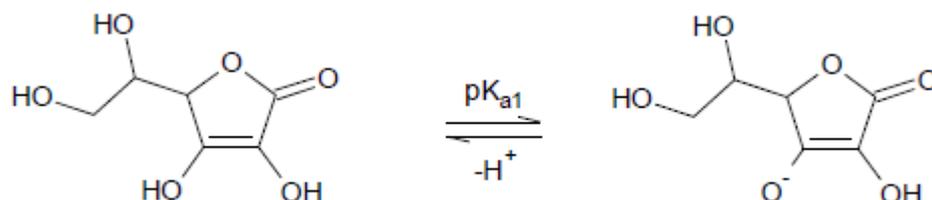


Figure 4. Dissociation de l'acide ascorbique au pK_a de 4,17.

L'acide ascorbique présente un pouvoir réducteur intense car il réduit la liqueur de Fehling, le nitrate d'argent neutre, le permanganate de potasse neutre, le 2,6-dichlorophénol indophénol. Il décolore l'iode et il est oxydé par l'acétate de cuivre et la quinone.

1.1.5 Méthodes de dosage de la vitamine C

Le terme de vitamine C fait référence aux molécules ayant la même activité vitaminique *in vivo* que l'acide *L*-ascorbique (AA), ce qui inclut sa forme oxydée, l'acide déshydroascorbique (DHAA), qui peut être réduit en acide ascorbique dans le corps humain. Diverses méthodes sont proposées dans la littérature pour mesurer l'AA, et ce pour une grande variété de matériaux biologiques : titrimétrie, photométrie, polarométrie, ampérométrie, chromatographie en couche mince, chromatographie gazeuse, HPLC (Arya, Mahajan, & Jain, 2000; Ball, 2006; Hasselmann & Diop, 1983). Récemment, Pisoschi, Pop, Serban, & Fafaneata, (2014) ont également recensé les potentialités et les performances analytiques des méthodes électrochimiques de dosage de l'AA dans différents substrats.

La méthode AOAC de dosage de la vitamine C dans les jus est une méthode d'analyse titrimétrique qui exploite les propriétés réductrices de l'acide *L*-ascorbique. Elle repose sur la réduction du dichloro-2,6 phénolindophénol (DCPIP) qui est rose en milieu acide par l'AA, alors que la forme réduite de ce réactif est incolore. C'est une méthode rapide, précise et peu coûteuse, qui peut être miniaturisée pour une analyse spectrométrique par absorbance sur microplaques à 505 nm (Pénicaud, Peyron, Bohuon, Gontard, & Guillard, 2010). La limite de cette méthode est liée aux interférences possibles avec les substances pouvant réagir avec le DCPIP. Par ailleurs, seul l'AA est mesuré car le DHAA ne participe pas à la réaction rédox (Ball, 2006). Arya, Mahajan, & Jain, (2001) ont fait une revue des méthodes spectrométriques permettant de doser la vitamine C dans différents milieux. Toutes ces méthodes sont basées sur la réaction de l'AA avec un composé pour produire ou consommer une molécule qui peut être facilement mesurée par spectrophotométrie. Une méthode classique consiste à oxyder l'AA en DHAA qui réagit ensuite avec la dinitro-2,4

phénylhydrazine (DNPH) pour former un hydrazone de l'acide dicétogulonique, qui donne un composé brun stable en présence d'acide sulfurique ; celui-ci peut être dosé par absorption à 540 nm et il est proportionnel à la quantité totale d'AA et de DHAA (Ball, 2006).

Les méthodes physiques d'analyse, quant à elles, utilisent des mesures spectrophotométriques basées sur les propriétés d'absorption de l'acide L-ascorbique à 265 nm en milieu neutre ou des mesures électrochimiques grâce aux courants d'oxydation anodique observés sur des microélectrodes. La spectrométrie est rarement appliquée pour des dosages sur des aliments car elle suppose une extraction qui est rarement spécifique et il y a ensuite un risque d'interférences avec les autres substances extraites. L'extraction de l'AA de l'aliment se fait généralement par une solution d'acide métaphosphorique (AOAC, 1980), l'acidité de la solution d'extraction permettant d'éviter l'auto-oxydation de l'AA.

Les méthodes chromatographiques sont les seules qui permettent de séparer l'AA des autres substances et de s'affranchir des phénomènes d'interférence. L'AA est ensuite détecté soit par absorbance UV, soit à l'aide d'un détecteur ampérométrique, soit par spectrométrie de masse. Néanmoins, si l'on souhaite doser à la fois l'AA et le DHAA, il est nécessaire d'inclure dans la méthode une étape de réduction du DHAA en AA (Odriozola-Serrano, Hernandez-Jover, & Martin-Belloso, 2007; Takayanagi, Nishiuchi, Ousaka, Oshima, & Motomizu, 2009) ou une dérivation chimique avec la 4,5-diméthyl-1,2-phénylènediamine avant une détection par fluorescence (Nováková, Solich, & Solichová, 2008). Les méthodes HPLC sont très sélectives et généralement plus sensibles que les méthodes spectrométriques ou par titration. Un état de l'art des méthodes HPLC de détermination de l'AA et du DHAA a récemment été réalisé par Nováková et al., (2008); Spínola, Llorent-Martínez, & Castilho, (2014). Certaines de ces méthodes ont également été transposées en UPLC afin de réduire les temps d'analyse et les quantités de solvants utilisées (Klimczak & Gliszczynska-Swiglo, 2015; Spínola, Mendes, Câmara, & Castilho, 2013). Pour sa part, Deutsch, (2000) a fait l'inventaire des méthodes de quantification spécifiques au DHAA. La LC-MS reste la méthode la plus efficace en termes de temps, de précision (limite de quantification < 0.5 ng/mL) et de sélectivité (Szultka, Buszewska-Forajta, Kaliszan, &

Buszewski, 2014). Elle permet en outre l'identification et le dosage des produits de dégradation.

L'analyse directe par spectrométrie UV reste néanmoins une méthode intéressante car rapide et peu coûteuse pour la quantification de l'AA et du DHAA dans des milieux simples en solutions, où l'absorbance de l'AA ne risque pas d'être parasitée par d'autres molécules. En effet, elle offre une réponse sensible et rapide via une méthodologie plus simple à développer (Kalus & Filby, 1986). L'AA présente une absorbance maximale pour des longueurs d'ondes entre 244 et 265 nm selon le pH. Le DHAA en solution absorbe les UV à 185 nm, mais très peu au-dessus de 220 nm (Deutsch, 2000). Il est donc nécessaire d'opérer une réduction du DHAA avant la mesure, généralement avec du dithiothréitol (DTT) qui est une petite molécule redox, de formule chimique HSCH₂CH(OH)CH(OH)CH₂SH (**Figure 5**) (Esteve, Farré, Frigola, & Garcia-Cantabella, 1997; Nováková et al., 2008; Takayanagi et al., 2009).

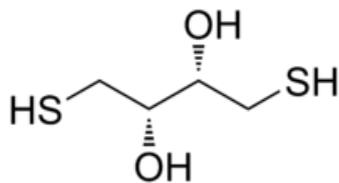


Figure 5. Formule chimique du dithiothréitol

Le Tris(2-carboxylethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), le dimercaptopropanol (Chebrolu, Jayaprakasha, Yoo, Jifon, & Patil, 2012; Odriozola-Serrano et al., 2007), ou la cystéine (Chiari, Nesi, Carrea, & Righetti, 1993; Herrero-Martinez, Simo-Alfonso, Deltoro, Calatayud, & Ramis-Ramos, 1998) peuvent aussi être utilisés. Odriozola-Serrano et al., (2007) a néanmoins montré qu'il était possible d'obtenir de bien meilleurs rendements de conversion en utilisant le DTT comme agent réducteur plutôt que le dimercaptopropanol. Les teneurs en DHAA sont ensuite calculées en soustrayant la teneur en AA initialement mesurée sur l'échantillon de la teneur totale mesurée après réduction du DHAA. L'inconvénient de cette méthode est que les agents de réduction peuvent interférer avec la

mesure et diminuer la sensibilité de la méthode. Cependant, la réaction de réduction du DHAA est rapide (moins de 10 min) et peut permettre une quantification rapide du DHAA.

1.2 La réactivité de l'acide ascorbique

La stabilité de l'AA dépend fortement des conditions environnantes telles que le pH, la température, l'exposition à la lumière et la concentration du milieu en oxygène et en trace d'ions métalliques.

D'une manière générale, l'AA est beaucoup plus stable à faible pH ($< pK_1 = 4,17$) sous sa forme non dissociée, car c'est l'ion ascorbate qui s'oxyde en présence d'oxygène. D'autre part, les voies réactionnelles de dégradation chimique de la molécule diffèrent selon que l'on est en conditions aérobies ou non aérobie, et en présence ou en absence de catalyseurs métalliques (Gregory, 1985).

1.2.1 Voies de dégradation anaérobie ou non oxydatives

Le terme de voies de dégradation anaérobie fait référence ici à des voies de dégradation de l'AA qui ne requièrent pas d'étape oxydative, mais qui peuvent tout de même avoir lieu en présence d'oxygène. Selon la température appliquée et la disponibilité de l'oxygène, elles vont entrer en compétition avec les voies oxydatives. Elles correspondent à des mécanismes complexes qui n'ont pas été entièrement mis à jour. Cependant les études faites par Kurata & Sakurai, (1967) sur de l'acide ascorbique chauffé en solution tampon acide (pH = 2,2) en absence d'oxygène montrent que dans ces conditions l'AA est dégradé en furfural, avec la formation de 3-déoxy-L-pentosone comme intermédiaire (**Figure 6**). Cette réaction s'accompagne par ailleurs d'une coloration jaune-brun de la solution.

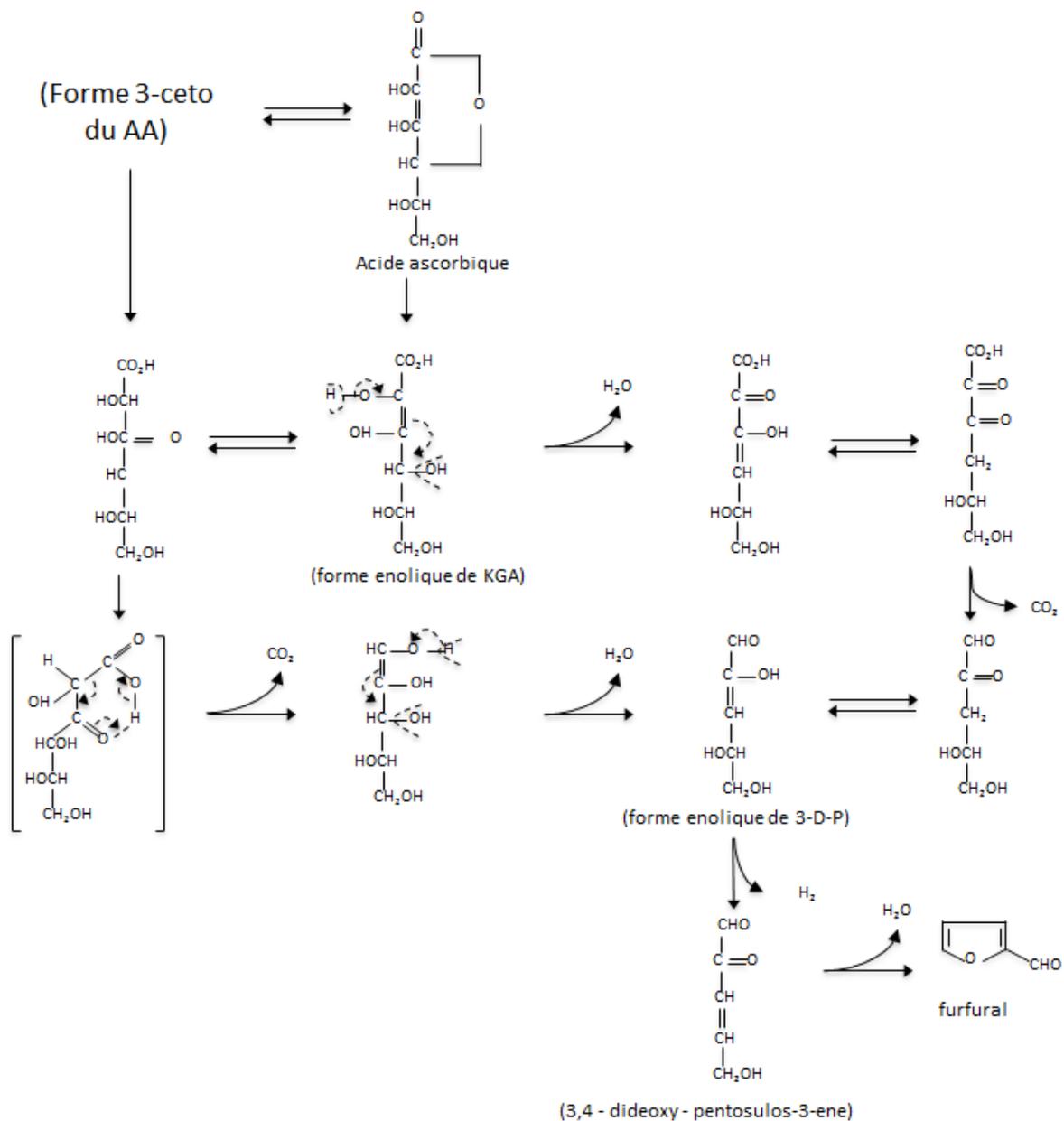


Figure 6. Voie de dégradation non oxydative de l'AA proposée par Kurata & Sakurai, (1967).

La formation de furfural lors du chauffage anaérobie de produits contenant de l'AA et son accumulation proportionnelle à la disparition de l'AA a été mise en évidence par plusieurs auteurs (Louarme & Billaud, 2012; Robertson & Samaniego, 1986; Rodriguez, Sadler, Sims, & Braddock, 1991; Vernin, Chakib, Rogacheva, Obretenov, & Cyril, 1998).

1.2.2 Voies de dégradation aérobie ou oxydatives

En présence d'oxygène et d'eau, l'acide ascorbique est oxydé en acide déshydroascorbique, qui est instable en milieu aqueux et subit ensuite un clivage irréversible de son cycle par hydrolyse pour former l'acide 2,3-dicétogulonique (Szultka et al., 2014) (**Figure 7**). La transformation de l'AA en DHAA est souvent décrites comme un équilibre réversible, alors que l'étape d'hydrolyse du DHAA est irréversible (Serpen & Gokmen, 2007).

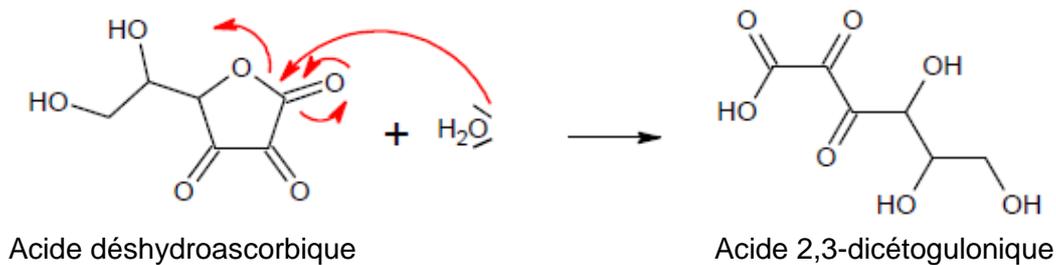


Figure 7. Réaction de dégradation irréversible du DHAA en acide dicétogulonique.

Bien de la plupart des auteurs décrivent ainsi de manière assez simple cette première étape de dégradation oxydative de l'AA, il s'agit en réalité d'une suite de réactions qui dépend d'équilibres entre les formes anioniques de l'AA et donc du pH de la solution. Un schéma complet de ces équilibres proposé par Bradshaw, Barril, Clark, Prenzler, & Scollary, (2011) est illustré sur la **Figure 8**. L'ion ascorbate (HA⁻) peut aussi former un radical par perte d'un électron. Selon Danilewicz, (2003), à pH compris entre 2 et 5,5, la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique est proportionnelle à la concentration en ion ascorbate. Wilson et al., (1995a) ont montré qu'en présence d'un catalyseur métallique, c'est la forme radicalaire de l'AA qui est oxydée en solution par l'oxygène moléculaire, pour former le DHAA qui est ensuite consommé par hydrolyse.

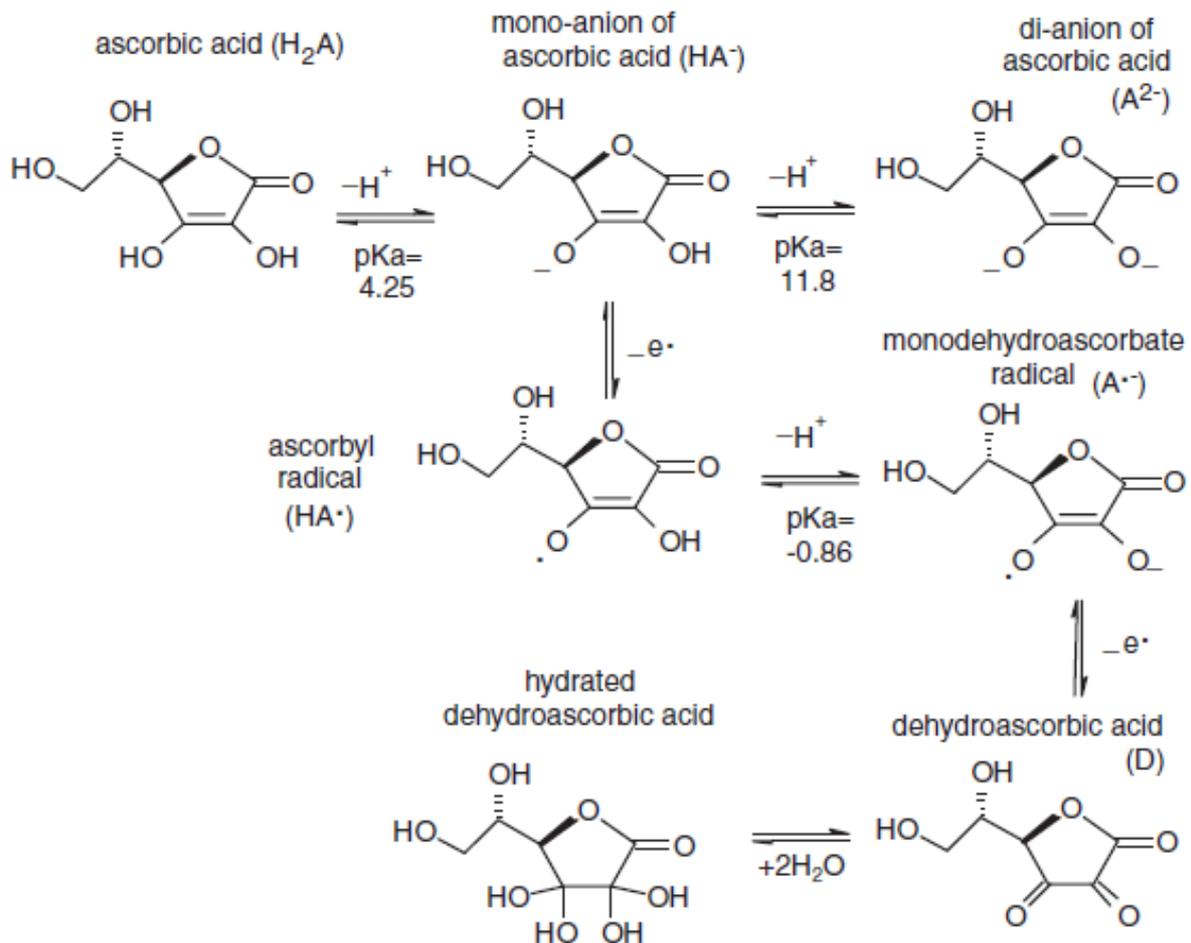


Figure 8. Equilibres acido-basiques, d'oxydation et d'hydratation associés à l'AA et au DHAA (Bradshaw et al., 2011).

L'acide 2,3-dicétogulonique est encore plus instable que son prédécesseur et va être décarboxylé en *L*-Xylosone, puis générer une grande variété de composés selon diverses voies mal identifiées à ce jour (Bradshaw et al., 2011; Yuan & Chen, 1998). Yuan & Chen, (1998) ont identifié deux produits terminaux de la voie oxydative issus du DHAA : le 3-hydroxy-2-pyrone et l'acide 2-furoïque, selon un mécanisme de dégradation représenté sur la **Figure 9**.

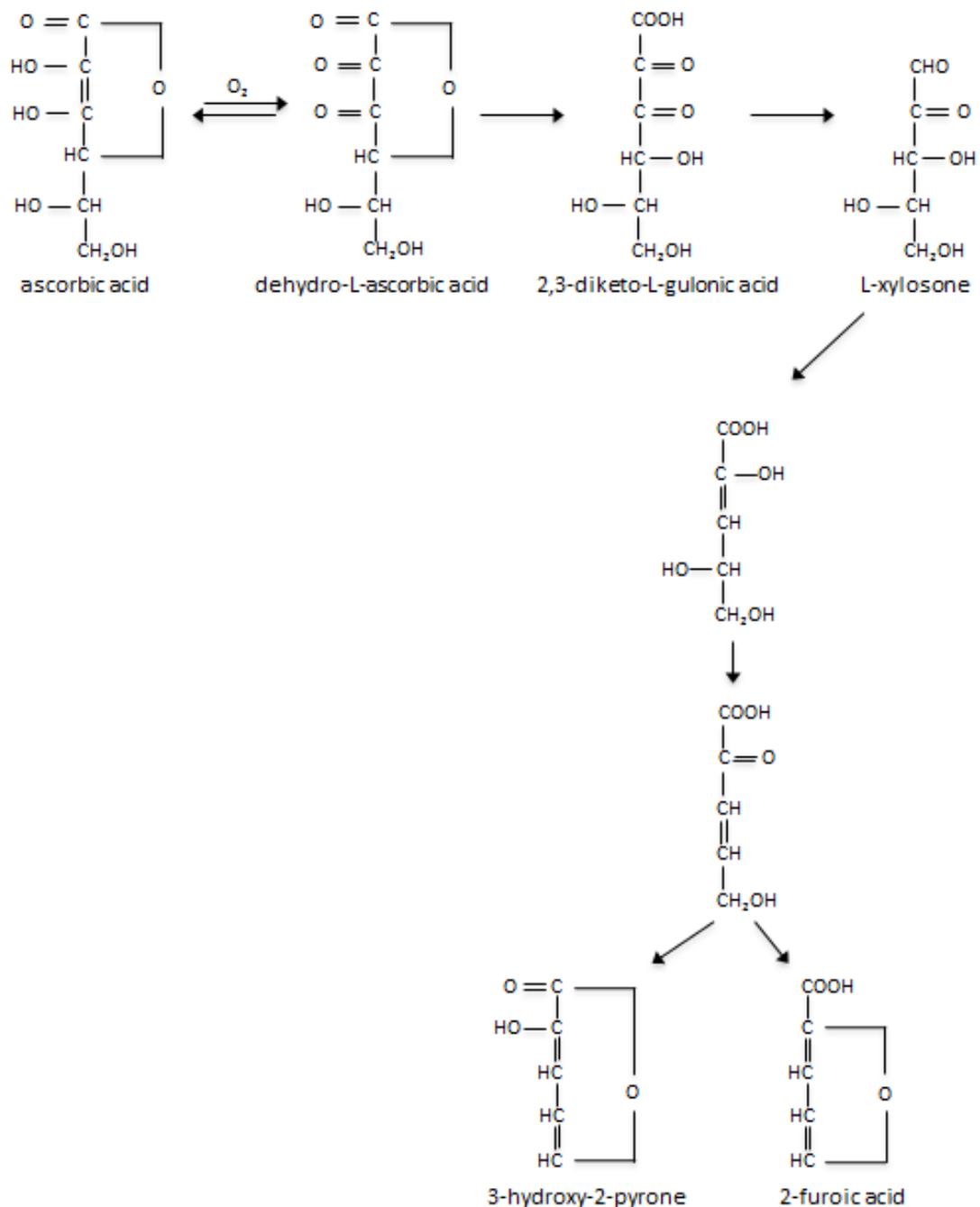


Figure 9. Mécanisme de dégradation oxydative de l'acide ascorbique (Yuan & Chen, 1998).

La réaction est catalysée en présence de traces d'ions métallique Cu(II) ou Fe(III). Ce phénomène est bien connu depuis les années 20, mais les mécanismes sont toujours controversés (Bradshaw et al., 2011).

L'oxydation de l'AA en conditions aérobies est un phénomène complexe qui dépend fortement des conditions physico-chimiques appliquées.

1.2.3 Impact des conditions physico-chimiques sur la réactivité de l'acide ascorbique

La dégradation de l'acide ascorbique peut être affectée par plusieurs facteurs comme mentionné précédemment. L'impact de ces facteurs a été étudié par plusieurs auteurs dans différents milieux (Blaug & Hajratwala, 1972). Nous présentons ici une synthèse des résultats acquis essentiellement en solutions.

1.2.3.1 Effet du pH

Wilson et al., (1995a) ont étudié l'effet du pH entre 1 et 9,5 sur les cinétiques de dégradation aérobie de l'acide ascorbique en solution tampon à 25 °C pendant 90 h. Ils ont mis en évidence une augmentation significative de la vitesse de réaction avec le pH en milieu acide entre 1 et 4. A pH plus élevés, la vitesse de dégradation ne varie quasiment plus en fonction du pH. Golubitskil, Budko, Basova, Kostarnoi, & Ivanov, (2007) ont obtenu des résultats similaires, avec une augmentation de la vitesse de dégradation de l'AA quand le pH augmente de 1 à 4,4, puis une légère diminution entre 5,4 et 7,2 et une stabilisation à pH basiques jusqu'à 8,4. Ceci est dû au déplacement de l'équilibre entre la forme acide et la forme ascorbate jusqu'au pK_1 , l'ion étant plus réactif. Cet effet est ensuite atténué aux pH plus basiques. Blaug & Hajratwala, (1972) ont regardé l'effet combiné du pH et de la température et ont identifié des énergies d'activation qui varient avec le pH de la solution, ce qui signifie sans doute que les mécanismes réactionnels varient avec le pH. Ceci peut s'expliquer par les variations du pK_a de l'AA avec la température (Humeres, Quijano, & Sierra, 1990). Blaug & Hajratwala, (1972) ont mesuré expérimentalement un pK_1 égal à 3,78 à 67 °C, avec une vitesse de dégradation de l'AA maximale au voisinage du pK_1 .

Rojas & Gerschenson, (1997b) ont quant à eux analysé l'effet du pH entre 3,5 et 5 sur la dégradation non oxydative de l'AA à plus haute température (70 - 90 °C) dans des solutions aqueuses contenant du glucose ($a_w = 0,94$). Ils montrent que la vitesse de dégradation anaérobie de l'AA augmente également avec le pH, et ce quelle que soit la

température étudiée. Néanmoins, il est difficile dans ce système de dissocier les interactions entre réactions de dégradation de l'AA et réactions de brunissement non enzymatique du glucose.

Van den Broeck, Ludikhuyze, Weemaes, Van Loey, & Hendrickx, (1998) ont quant à eux étudié l'effet du pH (entre 4 et 8) sur la dégradation de l'acide ascorbique dans des solutions tampons en conditions isothermes à hautes températures (120 - 150 °C). Leurs résultats sont différents de ceux obtenus par Wilson et al., (1995a) ou Golubitskil et al., (2007) à température ambiante ou Rojas & Gerschenson, (1997b) à des températures intermédiaires, mais en conditions anaérobies. Il semblerait que dans ces conditions, la vitesse de dégradation de l'acide ascorbique est retardée à pH élevé. Pour expliquer cela, Van den Broeck et al., (1998) s'appuient sur les travaux de Coker, Davey, & Kristal, (1993) qui ont constaté que l'augmentation du pH de 0,5 à 11 diminue la dégradation anaérobie de la vitamine C, tandis que la dégradation oxydative est favorisée. L'ouverture du cycle lactone est favorisée en milieu acide (pH = 3 - 4), conduisant à la formation de furfural. L'AA est donc moins thermostable en milieu acide qu'en milieu basique. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec ceux de Yuan & Chen, (1998), qui ont eux aussi étudié l'effet du pH (entre 1 et 10) sur la dégradation de l'acide ascorbique à 100 °C en suivant spécifiquement la formation de 4 composés : le furfural (produit de la voie non oxydative), l'acide 2-furoïque et le 3-hydroxy-2-pyrone (produits de la voie oxydative, issus de la dégradation du DHAA) et un quatrième composé non identifié. Leurs résultats montrent que les concentrations en furfural, en acide 2-furoïque et en 3-hydroxy-2-pyrone formés sont maximales à pH < 2 et qu'à pH = 1 le furfural est le principal produit de dégradation. Sa concentration est nettement augmentée, de 21,6 à 190,2 mg/L, quand le pH est abaissé de 2 à 1. Aux pH basiques, le composé non identifié dans cette étude est prédominant, et à pH = 10, seules des très petites quantités de furfural et d'3-hydroxy-2-pyrone ont pu être mesurées (**Figure 10**).

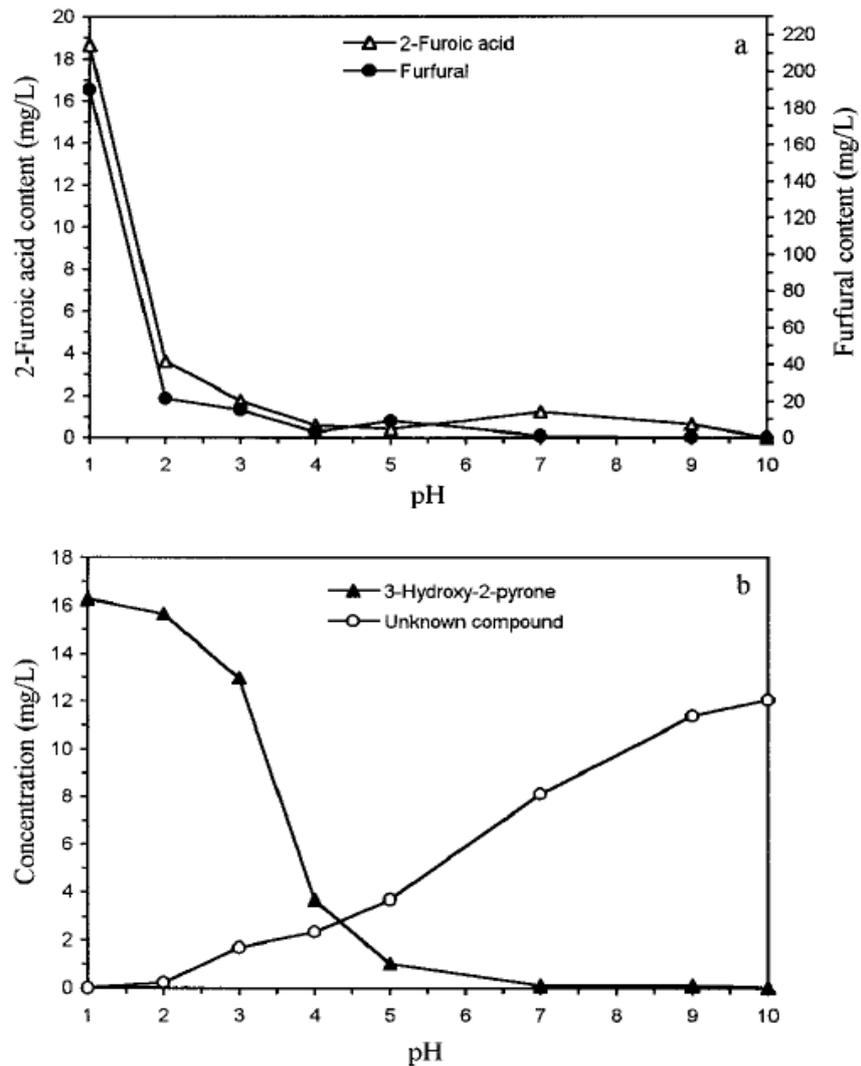


Figure 10. Effet du pH sur la formation des produits de dégradation de l'AA après 2 h de chauffage à 100 °C (Yuan & Chen, 1998).

1.2.3.2 Effet de la température

L'impact thermique des procédés de transformation sur la dégradation de l'AA dans les aliments a été largement étudié et très souvent décrit par des cinétiques d'ordre 1 (ou des temps de réduction décimale) liées à la température par une loi de type Arrhenius et une énergie d'activation. Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de la température dans des domaines relatifs au stockage et à la conservation des produits (Pénicaud, 2009), mais peu de données décrivent explicitement l'effet de la température à des valeurs supérieures à 40 °C dans des milieux simples permettant de s'affranchir des réactions couplées avec

d'autres molécules présentes dans le milieu. Dans des conditions un peu particulières, Hsu, Tsai, Fu, & Wu, (2013) ont étudié la dégradation de l'acide ascorbique et la formation de composés colorés dans des solutions éthanoliques à pH = 3,2 (mimétiques de produits alcoolisés comme les liqueurs de fruits ou les vins blancs) pour différentes conditions de températures (25, 35 et 45 °C) et sur des durées de 36 jours. Ils ont trouvé une augmentation de la vitesse de dégradation de l'acide ascorbique avec une élévation de la température, induisant une dégradation totale de l'AA après 8 jours de stockage à 45 °C, et des énergies d'activation qui varient entre 43 et 97 kJ/mol selon le degré alcoolique de la solution.

A plus hautes températures (70 - 90 °C), Rojas & Gerschenson, (1997b) ont étudié l'effet de la température sur la dégradation de AA dans une solution tampon à pH = 3,5 contenant du glucose ($a_w = 0,94$). Ils ont montré que l'augmentation de la vitesse de réaction avec la température pouvait être simulée en ajustant un modèle cinétique d'ordre 1 sur les données avec une énergie d'activation de l'ordre de 105 kJ/mol. Van den Broeck et al., (1998) ont montré sur des solutions tampon à pH = 7 qu'à des températures supérieures à 100 °C, c'est la voie de dégradation non oxydative de l'AA qui est prépondérante. Oey et al., (2006) ont quant à eux montré qu'une augmentation de la température de 100 à 120 °C induisait une augmentation de la vitesse de dégradation de l'AA, sans toutefois modifier la vitesse de la réaction oxydative, avec une vitesse apparente attribuée à cette réaction qui passe de 10^{-3} à $64 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. De la même manière, Laing et al., (1978) ont travaillé sur des produits modèles à humidité intermédiaire ($0,69 < a_w < 0,90$), sur lesquels une augmentation de la température entre 70 et 90 °C provoquait une augmentation de la vitesse de réaction, mais que celle-ci était fortement diminuée quand la température variait de 90 à 105 °C. Ceci est sans doute dû à une modification du schéma réactionnel, la voie oxydative devenant négligeable devant la voie anaérobie, et ce d'autant plus que les produits modèles contenaient des sucres et des protéines susceptibles de réagir avec l'AA pour former des produits de la réaction de Maillard. Enfin, Vernin et al., (1998) ont étudié la dégradation de l'AA dans des conditions extrêmes de températures, à 300 °C à sec

(pyrolyse) et à 180 °C dans un solvant alimentaire (propylène glycol). A 300 °C pendant 2 - 3 min, les principaux produits de réaction formés sont le furfural, le 2-hydroxy-2-cyclohexène-1-one et l'acide furoïque, issu de l'oxydation du furfural. A 180 °C, les auteurs n'ont retrouvé que très peu de dérivés furaniques, comme le furfural, mais ont identifié des 1,3-dioxolanes qui sont des produits de la réaction entre le propylène glycol utilisé comme solvant et des produits de la réaction de Maillard. En effet, au chauffage, l'acide ascorbique se comporte comme un sucre réducteur conduisant à la formation de produits de réactions de brunissement non enzymatique.

1.2.3.3 Effet de la présence d'oxygène

L'oxygène étant un des réactants de la réaction d'oxydation, la concentration en oxygène dissous est bien évidemment un facteur important impactant la vitesse de dégradation de l'AA. Penicaud et al., (2009) ont quantifié l'effet de l'oxygène sur la vitesse de dégradation de l'AA à 20 °C en milieu aqueux, montrant que cette vitesse augmente linéairement avec la concentration en oxygène dissous (**Figure 11**).

De la même manière, Van Bree et al., (2012) ont montré qu'une augmentation de 0,03 à 20,9% de la concentration en oxygène dans l'espace de tête au-dessus de solutions sucrées à pH = 3,5 stockées à 22 °C induisait une augmentation des vitesses de dégradation de l'AA et de la formation du DHAA, la première étant proportionnelle à la concentration en O₂ de l'espace de tête. Peu de résultats sont cependant disponibles sur l'influence de l'oxygène dissous à plus haute température. Eison-Perchonok & Downes, (1982) ont montré expérimentalement qu'une augmentation du taux d'oxygène dissous à 45 °C permettait de considérablement augmenter la vitesse de dégradation de l'AA en solution à pH = 6,1. Dhuique-Mayer et al., (2007) ont montré que la vitesse de dégradation de l'AA dans un jus de citron à 90 °C est multipliée par 10 quand la concentration initiale en oxygène dissous passe de 0,2 à 2,5 mg/L (**Figure 12**).

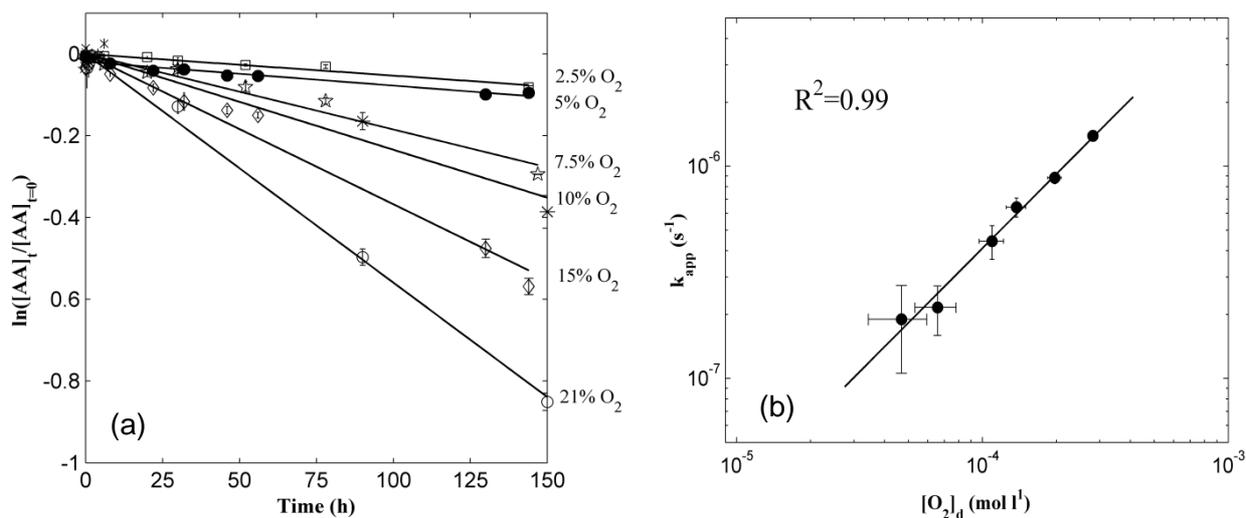


Figure 11. Influence de la concentration en oxygène dissous sur les vitesses de dégradation de l'AA en milieu aqueux à 20 °C. (a) Evolution de la concentration en AA en fonction du temps pour différents teneurs en oxygène, (b) vitesses apparentes de réaction calculées (ordre 1 par rapport à la concentration en AA) en fonction de la concentration en oxygène dans le milieu (Penicaud et al., 2009).

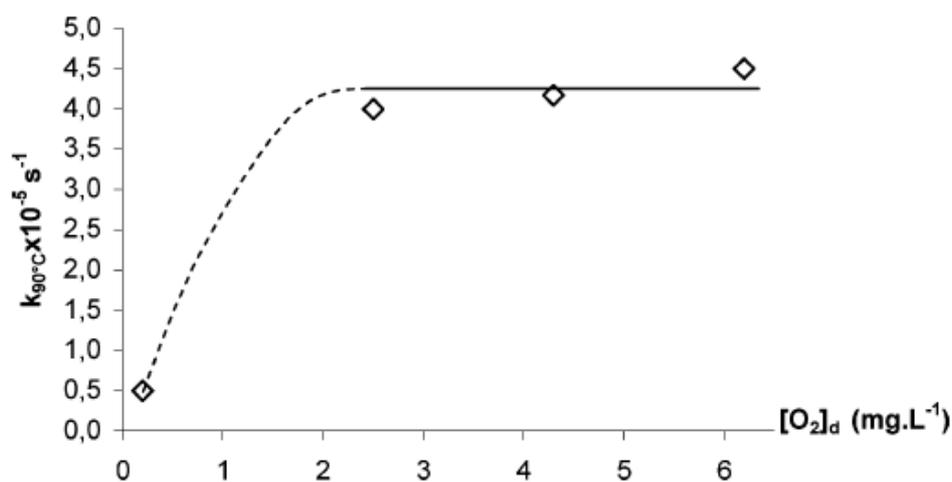


Figure 12. Influence de la teneur en oxygène dissous sur la vitesse de dégradation de l'AA dans un jus de citron à 90 °C (Dhuique-Mayer et al., 2007).

1.2.3.4 L'effet de l'exposition à la lumière

La dégradation de l'AA est accélérée par une exposition à la lumière visible ou aux radiations UV, surtout en présence de certains agents photosensibilisants comme la méthionine, la riboflavine, certains colorants ou certains agents sucrant comme le fructose (Tikekar, Anantheswaran, Elias, & LaBorde, 2011). Après un traitement UV, la dégradation de l'AA peut se poursuivre à l'obscurité et est d'autant plus importante que l'exposition initiale ou la température sont importantes. Yang & Min, (2009) ont ainsi montré que l'addition d'un colorant alimentaire rouge (FD&C Red Nr 3) permettait de multiplier par 5 la vitesse de dégradation de l'AA à pH = 4 après exposition UV et stockage à l'obscurité à 25 °C, alors que sa présence seule n'induisait aucune dégradation particulière de l'AA. Tikekar et al., (2011) ont étudié la formation du DHAA et de l'acide 2,3-dicétogulonique sur des solutions à pH = 3,3 (identique à celui des jus de fruits) exposées à des traitements UV à 254 nm. Ils ont observé une diminution de 40% de la teneur en AA au bout de 4 h, contre moins de 5% sans traitement UV, avec une augmentation significative des taux de DHAA et d'acide dicétogulonique. Ils ont par ailleurs montré qu'à pH = 7, cette dégradation était due à la génération de radicaux ascorbyl (AA^{*}).

1.2.4 Impact des procédés de transformations sur les dégradations de l'acide ascorbique dans les produits alimentaires.

On trouve dans la littérature un grand nombre d'articles consacrés à l'impact des procédés, notamment thermiques, sur la conservation de la vitamine C dans les aliments. Beaucoup concernent le traitement thermique (pasteurisation) de jus de fruits, notamment d'agrumes (orange, citron) naturellement riches en vitamine C (Dhuique-Mayer et al., 2007; Nagy, 1980). Gabriel, Usero, Rodriguez, Diaz, & Tiangson-Bayaga, (2015) ont étudié l'influence des caractéristiques physico-chimiques des jus et des variables de procédé sur la rétention d'AA et proposé un modèle quadratique prédictif de la teneur résiduelle en AA en

fonction de la concentration initiale en AA, de la température appliquée et du temps de traitement (**Figure 13**).

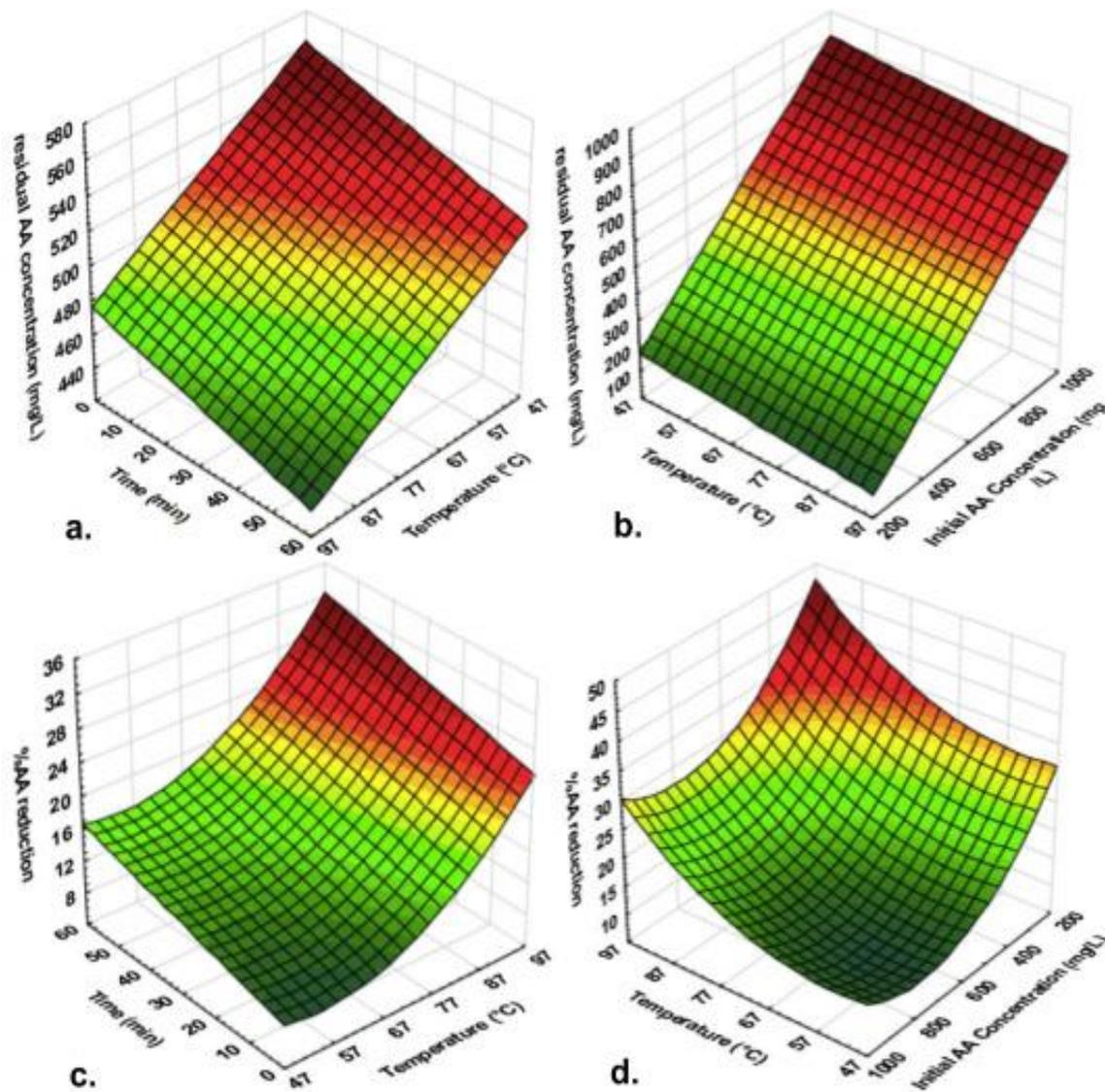


Figure 13. Surfaces de réponse indiquant les l'influence des variables significatives intrinsèque et de procédé sur la teneur résiduelle en AA et le pourcentage de perte. Point central utilisé : 72 °C, 30,3 min, $[AA]_0 = 600$ mg/L (Gabriel et al., 2015).

Van den Broeck et al., (1998) ont étudié l'effet de la température sur l'acide ascorbique dans le jus de tomates et le jus d'oranges à températures élevées (120 à 150 °C), en démontrant également pour ces deux produits une augmentation de la vitesse de dégradation due à une augmentation de la température. Mais la teneur en

oxygène de l'espace de tête dans les bouteilles dans lesquelles sont ensuite conservés les jus joue un rôle prépondérant dans la stabilité de la teneur en AA (Ryley & Kajda, 1994).

D'autres auteurs ont regardé l'influence des traitements thermiques type cuisson/pasteurisation sur la conservation de la vitamine C dans les produits à base de fruits et de légumes (Barrett & Lloyd, 2012; Davey et al., 2000; Eitenmiller, Ye, & Landen, 2008; Kalt, 2005; Lešková et al., 2006). La stérilisation des légumes entraîne généralement une diminution de la teneur en vitamine C des légumes (Rickman et al., 2007). Delchier, Reich, & Renard, (2012) ont quantifié les pertes en AA pour certains légumes verts après cuisson à l'eau bouillante ou à la vapeur respectivement égales à $\frac{3}{4}$ ou $\frac{1}{4}$ de la teneur initiale pour les épinards par exemple. D'autres auteurs ont montré que l'AA est particulièrement sensible au blanchiment, induisant des pertes variables de l'ordre de 5% (haricots verts), 16% (courgettes) ou 28% (asperges), mais ce traitement permet ensuite d'avoir une très bonne stabilité des teneurs obtenues lors de la congélation (Mazzeo et al., 2015). Dans certains cas, un traitement à haute température (> 70 °C) peut même s'avérer indispensable à la préservation de l'AA grâce à l'inactivation de certaines enzymes (acide ascorbique oxydase) qui en résulte (Leong & Oey, 2012; Munyaka, Makule, Oey, Van Loey, & Hendrickx, 2010). Louarme & Billaud, (2012) ont pour leur part comparé l'effet d'un traitement thermique de pasteurisation traditionnel à celui d'un chauffage ohmique sur des purées de pomme et ont montré que le chauffage ohmique permettait de réduire de 53% le taux de furfural formé par la dégradation non oxydative de l'AA.

Oey, Van der Plancken, Van Loey, & Hendrickx, (2008) ont fait une synthèse sur l'effet des traitements haute pression (HP) sur la préservation de la vitamine C dans les produits alimentaires. Les études montrent que la stabilité de l'AA dépend essentiellement des températures appliquées et de la présence d'oxygène et que sa dégradation est essentiellement due aux réactions d'oxydation qui ont lieu lors de la phase de chauffage adiabatique.

Enfin de nombreux travaux ont porté sur l'influence des procédés de séchage, notamment des fruits, sur la préservation de l'AA (Devahastin & Niamnuy, 2010; Muratore,

Rizzo, Licciardello, & Maccarone, 2008; Santos & Silva, 2008). La rétention de la vitamine C, exprimée par rapport à la masse sèche de produit, est souvent relativement faible après séchage. D'une manière générale, elle est fortement influencée par l' a_w et la température (Demiray, Tulek, & Yilmaz, 2013; Djendoubi Mrad, Boudhrioua, Kechaou, Courtois, & Bonazzi, 2012; Marfil, Santos, & Telis, 2008b); elle est néanmoins souvent d'autant plus faible que la durée de séchage est longue (faible température, forte humidité relative, épaisseur importante de produit) (Santos & Silva, 2008). La lyophilisation permet une bonne rétention de la vitamine C, grâce aux très faibles températures appliquées, à la mobilité réduite des réactants (pas de phase liquide) et à la faible pression partielle en oxygène. La dégradation de la vitamine C peut aussi être limitée par le séchage sous atmosphère inerte qui limite la présence d' O_2 (Ramesh, Wolf, & Jung, 2001) ou sous vide (Sablani, 2006). La déshydratation osmotique par contre a tendance à provoquer une diminution importante de la teneur en vitamine C du fait de son entrainement par l'eau qui est extraite en solution (Devic, Guyot, Daudin, & Bonazzi, 2010).

1.3 Modélisation des mécanismes de réaction de l'acide ascorbique en fonction des conditions physico-chimiques.

Selon le niveau auquel les observations de la réaction sont faites, on peut distinguer une modélisation apparente des réactions à l'échelle de l'aliment ou une modélisation des réactions à l'échelle moléculaire. La première peut permettre une approche empirique de l'effet des paramètres appliqués sur la prédiction de la dégradation de la qualité nutritionnelle et l'optimisation de la conduite des procédés (Devahastin & Niamnuy, 2010). La seconde est très utile pour identifier les réactants et comprendre les mécanismes réactionnels (Pénicaud, 2009).

Dans la plupart des travaux cherchant à modéliser la dégradation de l'AA à l'échelle de l'aliment, le rôle de la teneur en oxygène est rarement pris en compte explicitement dans l'écriture des modèles. Pour les produits solides, la prise en compte de la diffusion des

réactants, et notamment de l'oxygène, est indispensable pour comprendre quels sont les phénomènes limitant la vitesse de réaction (transfert de matière *versus* cinétique réactionnelle) et proposer des stratégies pour la conservation ou la transformation des aliments (Pénicaud, Broyart, Peyron, Gontard, & Guillard, 2011).

1.3.1 Modélisation des réactions apparentes à l'échelle de l'aliment

Dans les produits alimentaires, les cinétiques de dégradation de l'AA sont représentées selon les auteurs par différents modèles cinétiques apparents, d'ordre 0 (Laing et al., 1978), d'ordre 1 (Burdurlu et al., 2006), de pseudo ordre 1 (Patkai, Kormendy, & Kormendy-Domina, 2002; Uddin, Hawlader, Ding, & Mujumdar, 2002), ou d'ordre 2 (Eison-Perchonok & Downes, 1982; Singh, Heldman, & Kirk, 1976) (**Tableau 3**).

Tableau 3. Caractéristiques des principaux modèles cinétiques apparents.

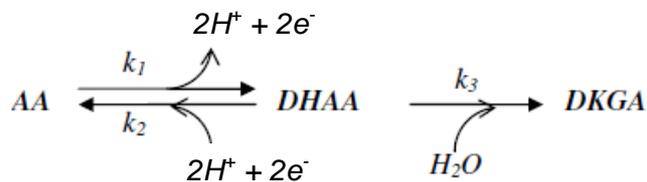
Type de modèle	Réaction prise en compte	Equation cinétique
Réaction d'ordre 0	$AA \rightarrow P$	$-\frac{dC_{AA}}{dt} = k$
Réaction d'ordre 1	$AA \rightarrow P$	$-\frac{dC_{AA}}{dt} = kC_{AA}$
Réaction de pseudo ordre 1	$AA + O_2 \rightarrow P$	$-\frac{dC_{AA}}{dt} = k'C_{AA} = kC_{AA}C_{O_2}^0$
Réaction d'ordre 2	$AA + O_2 \rightarrow P$	$-\frac{dC_A}{dt} = kC_{AA}C_{O_2}$

C_{AA} , C_{O_2} : concentrations des réactants à chaque instant t ; $C_{O_2}^0$: concentration initiale en oxygène ; k et k' : constantes de réactions.

Dans la majorité des cas, les auteurs choisissent de décrire l'effet du temps et de la température par des lois cinétiques de pseudo ordre 1 par rapport à la concentration en AA, avec une vitesse de réaction qui s'écrit $r = k[AA]$ et qui est liée à la température T par une

relation dérivée empiriquement de la loi d'Arrhenius : $k = k_0 \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$, où E_a désigne une énergie d'activation et R la constante universelle des gaz parfaits. Selon les études, les énergies d'activation identifiées varient entre 20 et 130 kJ/mol (Bosch et al., 2013; Devahastin & Niamnuy, 2010; Lešková et al., 2006). Lavelli & Vantaggi, (2009) ont ainsi calculé la vitesse de dégradation de l'AA au cours d'un stockage à 40 °C de morceaux de pommes déshydratées en fonction du niveau d' a_w finale (0,058 - 0,747).

Serpen & Gokmen, (2007) ont cherché à décrire les cinétiques de dégradation de l'AA et de formation/dégradation du DHAA en solution selon le schéma réactionnel ci-dessous, dans diverses conditions oxydantes et réductrices, à 90 °C.



Les vitesses de réactions sont données par les équations 1 et 2.

$$\frac{d[AA]}{dt} = -k_1[AA] + k_2[DHAA] \quad (1)$$

$$\frac{d[DHAA]}{dt} = k_1[AA] - k_2[DHAA] - k_3[DHAA] \quad (2)$$

En appliquant à ces équations différentielles une transformation de Laplace et en les réarrangeant, ils obtiennent les relations suivantes (Eq. 3 et 4):

$$AA = (m_{AA} * \exp(p_{AA} * t)) - (n_{AA} * \exp(q_{AA} * t)) \quad (3)$$

$$DHAA = (m_{DHAA} * \exp(p_{DHAA} * t)) - (n_{DHAA} * \exp(q_{DHAA} * t)) \quad (4)$$

où les coefficients m_i , n_i , p_i , q_i dépendent des constantes de réaction k_1 , k_2 , k_3 , et des concentrations initiales en AA et DHAA. Ces coefficients ont été ajustés sur les cinétiques expérimentales pour chacune des conditions testées, ce qui a ensuite permis de calculer les constantes de réactions. Ce modèle a permis de montrer de ces constantes varient beaucoup selon les conditions d'oxydo-réduction du milieu à une température donnée (Tableau 4).

Tableau 4. Constantes de vitesse de réaction de l'AA et du DHAA calculées par Serpen & Gokmen, (2007), pour différentes conditions d'oxydo-réduction, en solution à 90 °C.

	k_1 (s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	k_3 (s ⁻¹)
Control	$6,06 \times 10^{-5} \pm 1,29 \times 10^{-6}$	$6,92 \times 10^{-13} \pm 1,76 \times 10^{-10}$	$6,06 \times 10^{-5} \pm 1,49 \times 10^{-6}$
2 mg/L Cysteine	$2,71 \times 10^{-5} \pm 1,48 \times 10^{-7}$	$3,42 \times 10^{-5} \pm 1,78 \times 10^{-9}$	$7,22 \times 10^{-6} \pm 1,09 \times 10^{-6}$
20 mg/L Cysteine	$1,89 \times 10^{-5} \pm 2,92 \times 10^{-7}$	$4,47 \times 10^{-5} \pm 4,56 \times 10^{-9}$	$7,94 \times 10^{-6} \pm 1,02 \times 10^{-6}$
2 mg/L Fe³⁺	$8,58 \times 10^{-5} \pm 2,36 \times 10^{-6}$	$5,11 \times 10^{-13} \pm 3,19 \times 10^{-13}$	$8,50 \times 10^{-5} \pm 2,25 \times 10^{-6}$
20 mg/L Fe³⁺	$1,25 \times 10^{-4} \pm 1,75 \times 10^{-7}$	$5,89 \times 10^{-13} \pm 7,92 \times 10^{-13}$	$1,25 \times 10^{-4} \pm 3,31 \times 10^{-7}$

Ces résultats montrent l'importance de la composition et du potentiel d'oxydo-réduction du milieu lors d'un traitement thermique sur les voies d'oxydation de l'AA.

Vieira, Teixeira, & Silva, (2000) ont identifié les constantes cinétiques de dégradation de l'AA et du DHAA au cours du traitement thermique (60 - 99 °C) d'un nectar de cupuaçu (fruit exotique brésilien), en posant 2 réactions irréversibles consécutives de pseudo ordre 1. Ces constantes dépendent de la température selon une loi d'Arrhenius calculée par rapport à une température moyenne de référence de 80 °C (Eq. 5).

$$\ln(k) = \ln(k_{T_{ref}}) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (5)$$

En effet, étant donnée la forte corrélation entre E_a et le facteur pré-exponentiel k_0 dans la loi d'Arrhenius, il est préférable de reparamétriser cette loi en l'exprimant par rapport à une température de référence, choisie de préférence au centre du domaine de températures étudiées (Peleg, Normand, & Corradini, 2012; Van Boekel, 2008).

Les paramètres, identifiés par régression non linéaire sur l'ensemble des données, permettent de prédire la teneur résiduelle en vitamine C des jus et les durées de traitement pour lesquelles les teneurs en DHAA sont suffisantes pour les protéger du brunissement non enzymatique.

Oey et al., (2006a) ont choisi de garder une approche similaire, mais d'intégrer l'effet de l'oxygène en décomposant la cinétique comme la somme de 2 réactions d'ordre 1, l'une aérobie et l'autre anaérobie (Eq. 6) :

$$C_t = C_a \times \exp(-k_a t) + C_{an} \times \exp(-k_{an} t) \quad (6)$$

où C_a et C_{an} représentent respectivement les proportions de dégradation aérobie et anaérobie (%). Les vitesses de réaction k_a et k_{an} dépendent de la température selon une loi d'Arrhenius exprimée par rapport à une température de référence. Ce type d'approche permet de prédire la quantité d'AA à ajouter pour protéger d'autres nutriments ou garantir un niveau d'AA résiduel. Mais elle ne permet pas d'extrapoler les résultats à d'autres milieux.

D'autres auteurs privilégient des approches plus globales et plus empiriques, avec des modèles permettant d'ajuster facilement les données cinétiques expérimentales, mais qui n'ont pas de portée explicative des phénomènes. Par exemple, Marfil et al., (2008b) ont modélisé à l'aide d'une équation de Weibull (Eq. 7), la perte en AA au cours du séchage par air chaud (entre 50 et 70 °C) de tomates entières pelées (par immersion dans une solution de soude à 6% m/m) et éventuellement prétraitées par immersion dans une solution osmotique, ou de tomates non pelées coupées en deux.

$$\frac{[AA]_t}{[AA]_0} = \exp\left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right] \quad (7)$$

Où les paramètres α et β sont ajustés par régression non linéaire sur les cinétiques mesurées au cours du séchage. Dans le cas présent, l'identification conduit à un $\beta = 1$ (ce qui revient à écrire une réaction de pseudo ordre 1), sauf pour les tomates coupées en deux ($\beta > 1$), pour lesquelles la dégradation est plus importante en fin de séchage. Manso, Oliveira, Oliveira, & Frias, (2001) ont utilisé la même approche pour décrire la dégradation de l'AA dans des jus d'orange entre 20 et 45 °C, avec une identification globale par régression non linéaire sur l'ensemble des données acquises à différentes températures. Dans cette étude, le modèle empirique de Weibull permet de mieux décrire l'ensemble des cinétiques expérimentales (> 30 h), contrairement au modèle d'ordre 1 qui ne décrit bien que les temps courts, inférieurs à 8 h ou à un modèle mécanistique du type de celui développé par

Vieira et al., (2000), pour lequel les données disponibles semblent insuffisantes pour identifier proprement tous les paramètres des différentes voies réactionnelles.

1.3.2 Modélisation des cinétiques à l'échelle moléculaire

Si l'on considère les deux principales voies de dégradation de l'AA décrites plus haut, elles peuvent être écrites sous la forme de 2 réactions :

- $AA + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow DHAA + H_2O \rightarrow pP$ (pour la voie oxydative)
- $AA \rightarrow p'P'$ (pour la voie non oxydative)

P et P' étant des produits de ces réactions, affectés des coefficients stœchiométriques p et p'.

Dans certains cas, notamment en présence d'ions métalliques, la première réaction peut aussi s'écrire (Bradshaw et al., 2011) :



Dans les deux cas, la première étape de la réaction de dégradation de l'AA par voie oxydative est souvent décrite comme un équilibre réversible, dont on sait également qu'il dépend plutôt de la concentration en ion ascorbate AH^- que de la concentration en AA proprement dite.

Si les réactions sont des réactions moléculaires, les ordres des réactions dépendent directement des coefficients stœchiométriques. Pour la 1^{ère} réaction, on peut définir la vitesse de réaction par l'équation 8.

$$r = -\frac{d[AA]}{dt} = -2\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{1}{p}\frac{d[P]}{dt} = k[AA][O_2]^{1/2} \quad (8)$$

Néanmoins, dans des milieux complexes les réactions ne sont pas toujours exactement moléculaires ou pas suffisamment bien connues, si bien que les ordres partiels de réaction peuvent être différents des coefficients stœchiométriques et perdre ainsi leur sens physico-chimique. L'équation 8 s'écrit alors plus généralement sous la forme de l'équation 9 :

$$r = -\frac{1}{\alpha} \frac{d[AA]}{dt} = -\frac{1}{\beta} \frac{d[O_2]}{dt} = \frac{1}{p} \frac{d[P]}{dt} = k[AA]^\alpha [O_2]^\beta \quad (9)$$

où $\alpha + \beta$ est l'ordre global de la réaction (Van Boekel, 2008).

Si la réaction est réversible, la vitesse de réaction s'écrira par l'équation 10.

$$r = \frac{1}{\alpha} \frac{d[AA]}{dt} = -k_1[AA]^\alpha [O_2]^\beta + k_{-1}[P]^\delta \quad (10)$$

Dans tous les cas, on voit qu'il est nécessaire de bien connaître les variations de la teneur en oxygène dissous dans le milieu réactionnel pour prédire les vitesses de dégradation de l'AA. Mais comme souligné précédemment, peu de résultats expérimentaux tenant compte de cette mesure sont réellement disponibles.

Pénicaud, (2009) a étudié la dégradation de l'acide ascorbique dans l'eau, en milieu parfaitement agité, pour différentes teneurs en oxygène (0 - 21%), aux températures de stockage (8 - 33 °C). Elle a ensuite identifié un modèle cinétique d'ordre 1 par rapport à la concentration en AA et d'ordre β par rapport à la concentration en oxygène dissous dans le liquide, avec une dépendance de la constante de réaction à la température exprimée à l'aide d'une fonction reparamétrisée de la loi d'Arrhenius par rapport à une température de référence de 20 °C. Une estimation de l'erreur sur les valeurs de k_{app} identifiées pour chaque condition expérimentale a été réalisée par la méthode de Monte Carlo, en se basant sur l'incertitude sur la mesure de la concentration et de la concentration initiale en AA. Les résultats de cette simulation donnent des valeurs de β qui varient entre 0,6 et 1,6 selon les températures, avec une valeur moyenne de $1,1 \pm 0,9$, une constante de vitesse égale à $10^{-2} \text{ mol}^{-1,1} \text{ L}^{1,1} \text{ s}^{-1}$ et une énergie d'activation de 93 kJ/mol (mais avec des incertitudes relativement élevées sur les intervalles de confiance de ces deux derniers paramètres). Ce modèle a ensuite pu être couplé à un modèle de diffusion de l'oxygène pour prédire l'évolution des profils de concentration en AA dans un gel d'Agar au cours du temps de stockage.

Ce modèle a été utilisé par Devic, (2010) pour simuler l'évolution de la teneur en AA dans un morceau de pomme au cours d'un séchage convectif à 45 ou 60 °C et 2 m/s de vitesse d'air. Le modèle sous-estime très largement les pertes induites par le séchage (8% et

14% après 2 h et 5 h de séchage, contre respectivement 20% et 30% expérimentalement). Ceci est dû à la non prise en compte par le modèles des autres voies de dégradation de l'acide ascorbique (réduction des quinones formées par oxydation enzymatique en acide chlorogénique).

1.3.3 Conclusions

Il semble important de mieux identifier les mécanismes de réaction de l'acide ascorbique sur une vaste gamme de températures et de conditions d'oxygénation du milieu parfaitement contrôlées pour parvenir à construire un model réactionnel plus complet qui soit capable de prédire les teneurs en AA résiduel pour différentes conditions de transformation et de conservation.

Comme nous l'avons vu, plusieurs variables affectent la dégradation de l'acide ascorbique des fruits et des légumes telles que la température, le pH, l'humidité, l' a_w et la teneur en oxygène. Lors des procédés de transformation, d'autres paramètres interviennent comme la diffusion de l'oxygène. L'effet de la matrice elle-même mérite d'être analysé. Cependant, pour comprendre ce qui se passe dans les milieux complexes, il faut étudier la réactivité dans des systèmes simples et dans des conditions parfaitement maîtrisées.

1.4 Conclusion de l'analyse bibliographique

L'analyse bibliographique montre que la dégradation de la vitamine C (acide ascorbique et acide déshydroascorbique) a été largement étudiée. Cependant, deux domaines d'études se distinguent. D'une part, des travaux portant sur des matrices simples (solutions modèles) pour des conditions de température de stockage entre 5 et 45 °C. Ces études nous montrent que la température a un fort effet sur la dégradation de l'AA mais l'effet de la concentration en oxygène dissous est souvent mis en question. D'autre part, pour les études aux températures supérieures à 50 °C, les travaux sont plutôt réalisés sur des matrices complexes de type produits alimentaires. Ce travail bibliographique fait état de

modèles de dégradation de l'acide ascorbique partiellement satisfaisants, du fait des nombreux paramètres qui jouent sur la dégradation de l'AA dans les procédés de transformation. Pour arriver à comprendre le comportement de la vitamine C pendant des procédés de transformation de matrices complexes, il est nécessaire d'étudier préalablement l'AA dans des matrices simples et de manière séparée afin de bien identifier tous les paramètres impliqués dans sa dégradation. En effet, à notre connaissance, des données cinétiques dans la gamme de température entre 50 et 90 °C dans des matrices simples et en conditions d'oxygène contrôlées sont inexistantes.

L'objectif de la thèse est d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes de dégradation de la vitamine C.

Pour cela, une démarche en 3 points a été mise en place et consiste en :

1. La validation d'une méthode de dosage des acides ascorbique et déshydroascorbique, simple, rapide, fidèle et juste qui nous permette d'obtenir un grand nombre de données cinétiques.
2. La construction d'une base de données cinétiques de concentrations en acides ascorbique et déshydroascorbique pour une gamme de température entre 50 et 90 °C et des pourcentages d'oxygène dissous entre 10 et 30%, de manière à couvrir les conditions de température et disponibilité en oxygène des procédés de transformation alimentaires.
3. La construction d'un modèle cinétique prenant en compte un maximum de réactions identifiées et la détermination des paramètres réactionnels associés.

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1 Méthodes analytiques

2.1.1 Réactifs

L'acide ascorbique cristallin 99% (CAS n°50-81-7), l'acide déshydroascorbique 99% (CAS n°490-83-5), le DL-dithiothreitol 99% (CAS n°3483-12-3) et l'acétate d'éthyle 99,8% (CAS n°141-78-6) ont été fournis par Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

L'acide malique (CAS n°210-514-9), l'acide métaphosphorique 40-50% (CAS n°37267-86-0), le tris (hydroxyméthyl) aminométhane (CAS n°77-86-1) et le phosphate de sodium monobasique dihydraté (CAS n°13472-35-0) ont été fournis par VWR Prolabo chemicals (Luther Worth, Angleterre).

L'hydroxyde de sodium 97% (CAS n°1310-73-2), le phosphate de sodium dibasique dihydraté (CAS n°10028-24-7) et l'acide chlorhydrique 37% (CAS n°7647-01-0) ont été fournis par Carlo Erba (Val de Reuil, France).

2.1.2 Préparation des solutions

L'eau utilisée pour la préparation de solutions et les dilutions est de l'eau ultra pure (résistance 5 - 6 M Ω) obtenue grâce à un système de purification de l'eau ELIX (Milipore SAS, Molsheim, France).

Tampon malate 20 mM pH 3,8

La solution tampon malate est préparée par pesée de 1,34 g d'acide malique, ensuite dissous dans 500 mL d'eau ultra pure (soit une concentration finale de 20 mM), puis le pH est ajusté à 3,8 à l'aide d'une solution de soude 5 M.

Solution d'acide métaphosphorique 3% (m/V)

En sachant que l'acide métaphosphorique est sous forme de poudre à 40 - 50%, la solution est préparée par pesée de 33,3 g d'acide métaphosphorique ensuite dissous dans 500 mL d'eau ultra pure, soit une concentration finale de 3% (m/V).

Solution de DL-Dithiothreitol (DTT) 30 mM

La solution de DTT est préparée par pesée de 46,26 mg de DTT ensuite dissous dans 10 mL d'une solution tampon phosphate à 0,1 M pH 7,5.

Tampon phosphate 0,1 M pH 7,5

La solution tampon phosphate 0,1 M est préparée à partir de 80 mL de solution A, 420 mL de solution B et 500 mL d'eau ultra pure. Après le mélange, le pH doit être de 7,5. Si on n'obtient pas le pH, d'abord vérifier la calibration du pH-mètre, et si le problème continue, refaire la solution.

La solution A est composée de 15,6 g de phosphate de sodium monobasique dihydraté dissous dans 1 L d'eau ultra pure. La solution B est composée de 17,79 g de phosphate de sodium dibasique dihydraté dissous dans 1 L d'eau ultra pure.

Tampon tris HCl 0,2 M pH 8,2

La solution tampon tris est préparée par pesée de 12,114 g de poudre de Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane ensuite dissous dans 500 mL d'eau ultra pure. Le pH est alors ajusté à 8,2 à l'aide d'une solution de HCl 0,2 M.

2.1.3 Dosage de l'acide ascorbique (AA)

La méthode de dosage de l'acide ascorbique repose sur une détection spectrophotométrique de la molécule (Kalus & Filby, 1986). Son développement et sa validation ont fait l'objet d'une publication (soumise) et sont présentés dans la partie « résultats et discussions ». Seule la version définitive de la méthode utilisée pendant les cinétiques de dégradation à différentes températures est présentée ici.

La méthode est dite indirecte car elle nécessite un étalonnage préalable pour calculer la concentration des échantillons inconnus. Elle consiste à diluer des échantillons contenant l'acide ascorbique au 1/50^e avec de l'acide métaphosphorique 3% (m/V) dans des flacons bruns. Les dilutions sont ensuite placées dans des cuves en quartz. Leurs absorbances sont alors mesurées contre un blanc composé uniquement de tampon malate au 1/50^e dans l'acide métaphosphorique

L'appareil de mesure utilisé est un spectrophotomètre modèle SPECORD 210 Plus (Analytik Jena AG, Jena, Germany) avec une variation sur la reproductibilité d'ajustement de la longueur d'onde inférieure à $\pm 0,02$ nm. La lecture se fait par une méthode de balayage spectral, sur une gamme de longueurs d'ondes comprises entre 190 et 400 nm, avec une fente de 1 nm, une vitesse de lecture de 10 nm/s et un temps d'intégration de 0,1 s.

La validation de la méthode de dosage selon la méthode de Feinberg & Laurentie, (2010), a été obtenue à partir d'un total de 48 essais qui comptent 4 séries avec 4 niveaux de concentration et 3 répétitions par série. La méthode de dosage a été validée pour un domaine de concentrations en AA entre 0 et 6,95 mM, avec un recouvrement entre 95 et 99% et un coefficient de variation de 3 à 9% qui est inversement proportionnel à la concentration en AA.

La linéarité de la gamme d'étalonnage a été testée pour valider la méthode de dosage de l'AA en utilisant 4 séries de 5 niveaux de concentration et 3 répétitions pour chaque niveau de chaque série soit un total de 60 essais (**Figure 14**).

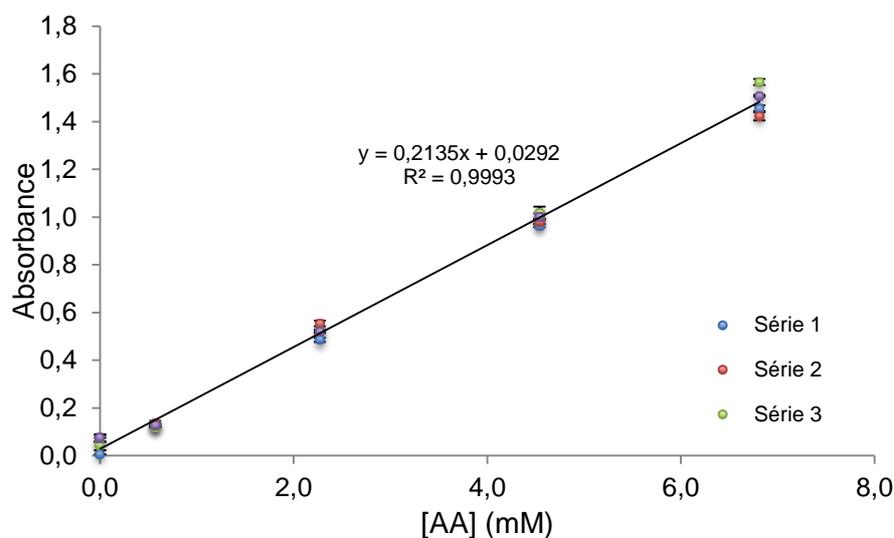


Figure 14. Gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique sur 4 séries de 5 concentrations répétées 3 fois (moyenne et écart-type sur chaque concentration de chaque série).

Les résultats ont montré une linéarité acceptable avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,9993$. Des limites de détection et de quantification de 0,235 et 0,467 mM respectivement ont été calculées par les équations 11 et 12.

$$LOD = \frac{a_0 + 3s_{a0}}{a_1} \quad (11)$$

$$LOQ = \frac{a_0 + 10s_{a0}}{a_1} \quad (12)$$

Où a_1 et a_0 sont respectivement la sensibilité ou pente et le blanc analytique ou ordonnée à l'origine obtenus avec la régression linéaire de la moyenne de la gamme d'étalonnage en AA par la méthode de moindres carrés. s_{a0} est l'écart-type standard mesuré sur le blanc.

Pour calculer la concentration en acide ascorbique, les absorbance des échantillons sont mesurées à 243 nm par le spectrophotomètre SPECORD 210 Plus (Analytik Jena AG, Jena, Allemagne). La valeur d'absorbance obtenue est utilisée dans l'équation de régression linéaire de la gamme d'étalonnage (eq. 13).

$$[AA] = \frac{A - 0,0292}{0,2135} \quad (13)$$

2.1.4 Dosage de l'acide déshydroascorbique (DHAA)

De la même façon que pour l'AA, la méthode de dosage du DHAA a été développée et validée avant son utilisation durant les cinétiques. Seule la version finale est présentée ici. Les détails du processus de validation, font également partie de la publication soumise et se trouvent dans le chapitre « Résultats et discussion ».

La méthode de dosage de l'acide déshydroascorbique est basée sur la réduction du DHAA en AA pour pouvoir le quantifier sous cette forme de la même façon que de l'AA natif (Louarme & Billaud, 2012). Le dithiothréitol (DTT) réduit le DHAA (forme oxydée) en AA. La lecture spectrophotométrique permet alors d'obtenir une quantité totale d'AA incluant l'AA natif et le DHAA converti. La quantité de DHAA est déterminée par différence entre le total et la quantité d'AA dosée avant réduction, en se basant sur le fait que la réaction est totale.

Pour la réduction du DHAA en AA, 0,5 mL d'échantillon (solution de DHAA ou d'AA+DHAA) sont mélangés à 0,5 mL de solution de DTT à 30 mM et 1 mL de tampon tris HCL 0,2 M pH 8,2 dans un tube à essai. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex et conservé dans un bain de glace, à l'obscurité, pendant 30 min. Après 30 min de réaction, 5 mL d'acétate d'éthyle (non miscible) sont ajoutés pour éliminer l'excès de DTT. Les tubes sont alors agités par rotation pendant 1 min afin de favoriser le contact entre les phases permettant l'extraction du DTT. Ensuite la phase supérieure est éliminée. L'extraction à l'acétate d'éthyle doit être répétée 3 fois. Une fois le DTT complètement éliminé, un volume suffisant de phase inférieure (environ 1 mL) est récupéré (en prenant soin de bien prélever au fond du tube) et placé dans un flacon brun.

A partir de ce moment, l'analyse reprend son cours de la même manière que pour l'AA natif (dilution au 1/50^e dans l'acide métaphosphorique, homogénéisation et mesure par spectrophotométrie), puisque l'échantillon ne contient désormais plus que de l'AA. La concentration en DHAA est déterminée à partir de la différence entre la concentration molaire en AA obtenue après la réduction du DHAA et la concentration molaire en AA initiale (AA avant la réduction). Les résultats obtenus sont alors traités avec un facteur de correction préalablement déterminé lors de l'étape de validation.

Les absorbances de chaque échantillon (avant (A_0) et après la réduction du DHAA en AA (A_{total})) sont mesurées par le spectrophotomètre. Ensuite la concentration en AA est calculée par l'équation 13 pour chaque valeur d'absorbance. Une fois que les concentrations avant ($[AA]$) et après réduction du DHAA en AA ($[DHAA + AA]$) sont obtenues, la concentration en DHAA est calculée par différence de ces deux concentrations (Eq. 14) :

$$[DHAA]_{bc} = [DHAA + AA] - [AA] \quad (14)$$

Cette concentration calculée, $[DHAA]_{bc}$ est la concentration en acide déshydroascorbique avant correction (bc = before correction). En effet, durant l'étape de validation il est apparu que cette valeur ne correspondait pas à la valeur théorique (pesée lors de la préparation des solutions standards). Dans ce cas, une correction de la valeur mesurée peut être appliquée (Feinberg & Laurentie, 2010). La vraie valeur de DHAA peut ainsi être calculée (Eq. 15) grâce aux paramètres de correction déterminés pendant la phase de validation :

$$[DHAA] = \left([DHAA]_{bc} \times \frac{1}{0.7524} \right) - (1.014 \times A_{total} + 0.1529) \quad (15)$$

La performance de la méthode de dosage du DHAA a été obtenue à partir d'un total de 153 essais et validée pour un domaine de gamme entre 0 et 5,15 mM avec un recouvrement entre 88 et 112% et un coefficient de variation (CV) de 3 à 22% inversement proportionnel à la concentration en DHAA. Les limites de détection et de quantification sont les mêmes que celles déterminées pour l'AA, du fait que le DHAA est mesuré sous forme d'AA.

2.2 Cinétique de dégradation

2.2.1 Dispositif expérimental

L'appareil utilisé pour réaliser les cinétiques de dégradation est un réacteur EasyMax 102 (Mettler Toledo, Geifensee, Suisse) (**Figure 15**).

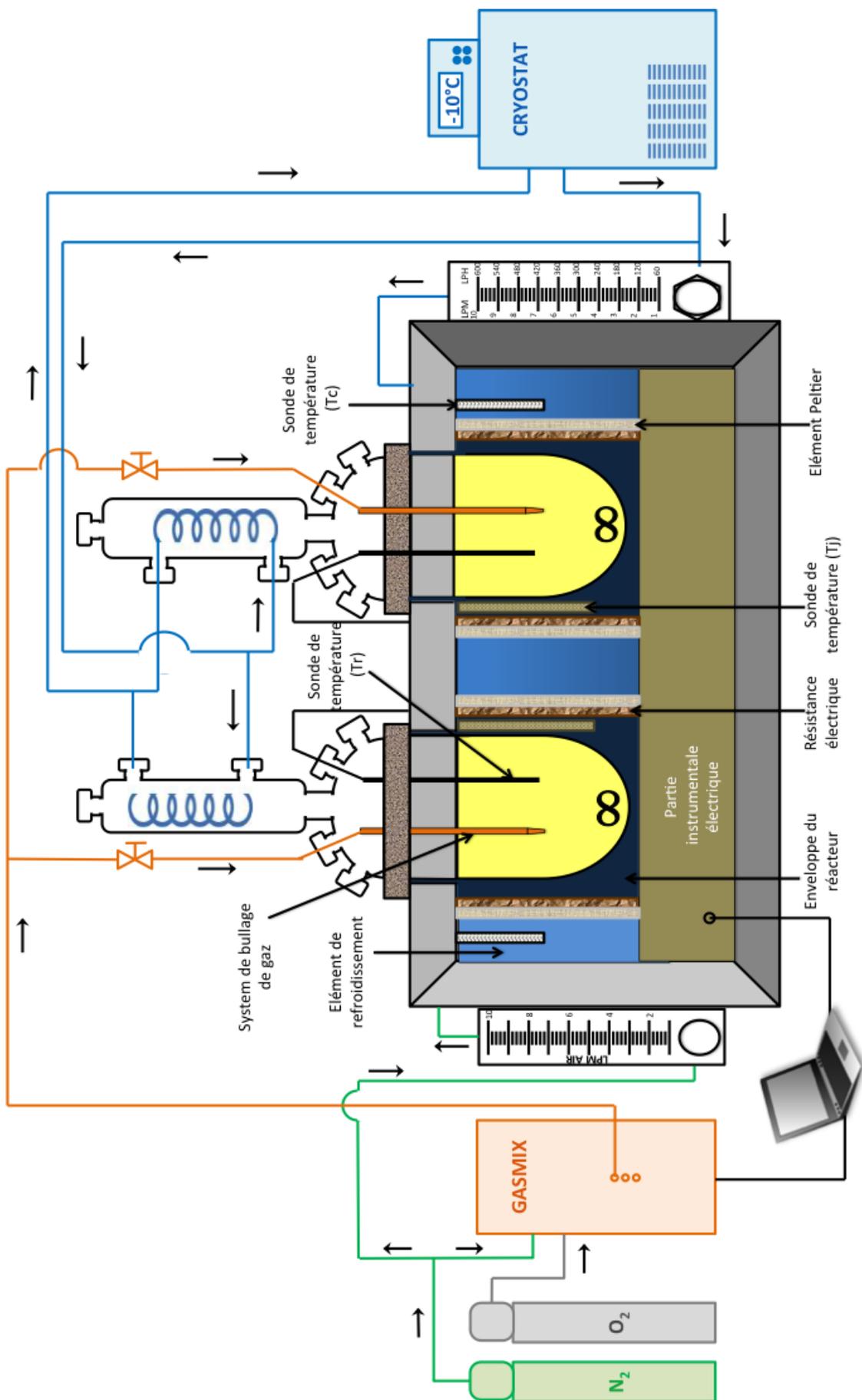


Figure 15. Dispositif expérimental

Cet appareil est composé de 2 blocs thermostatiques dans lesquels sont placés les réacteurs en verre (100 mL), qui permettent la régulation de la température entre -28 et 183 °C (± 1 °C). Les réacteurs sont à l'abri de la lumière et peuvent être éclairés à tout moment grâce à 2 LED afin d'observer les milieux réactionnels lors des expériences. Chaque réacteur est équipé d'un couvercle à 7 entrées, d'une sonde de température en platine, d'un réfrigérant, d'une agitation mécanique ou magnétique (50 à 1000 rpm). La régulation de température est effectuée via la mesure en ligne de trois températures (T_r , T_c et T_j) à l'aide de trois sondes de température Pt100 qui mesurent respectivement la température dans le réacteur (T_r), au niveau de l'élément Peltier (T_c) et à la paroi du réacteur (T_j). Le réacteur est piloté via le logiciel iControl EasyMax®4.1 qui nous permet de choisir la température (T_r) et l'agitation désirée dans le réacteur.

L'ensemble du système est refroidi grâce à un cryostat en continu (NESLAB RTE-300, Newington, Etats-Unis) afin de condenser les vapeurs émises, ce qui permet ainsi de limiter la perte de volume réactionnel pendant les cinétiques de dégradation. De plus, la circulation d'un gaz de balayage (azote) permet de limiter la condensation à l'intérieur de la boîte du dispositif et ainsi de protéger les parties instrumentales électriques.

Le réacteur est couplé à un mélangeur de gaz GasMix, (AlyTech, Juvisy-sur-Orge, France) qui permet d'injecter dans le réacteur le mélange de gaz en proportions maîtrisées.

2.2.2 Performance du dispositif expérimental

La performance du réacteur caractérise tout d'abord sa capacité à atteindre et maintenir la température pendant une durée de temps définie. La valeur de la température mesurée par les sondes Pt100 présentes dans chacun des réacteurs (T_r), a été vérifiée selon les normes NF EN ISO 10012 (Systèmes de management de la mesure - Exigences pour les processus et les équipements) et NF EN ISO/CEI 17052 (Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais), par un four étalon de température à puits sec (WIKA CTD 91000-450 N°581003, Klingenberg, Allemagne) associé

à une chaîne de mesure (Testo 735-1, Forbach, France). L'étalonnage a été fait en contrôlant tous les 10 °C dans un intervalle de température de 0 à 100 °C, les résultats ont montré une incertitude \leq à 0,5 °C pour chaque sonde de température du réacteur (T_r).

Par ailleurs, le maintien de la température sur la gamme choisie pour réaliser les cinétiques de dégradation (50 - 90 °C), a été vérifié au cours du temps. Les données de 3 cinétiques pour chaque température (enregistrées par le logiciel iControl EasyMax®4.1), ont été utilisées. La

Figure 16 montre la constance de la température pendant les cinétiques de dégradation de l'AA. Le logiciel permet un enregistrement de la température toutes les 2 secondes. Les artefacts identifiables sur les courbes ont plusieurs origines. La température plus élevée (2 °C) au début de chaque cinétique permet de compenser l'injection de liquide froid en début de cinétique et ainsi de travailler à température constante. D'autre part, les diminutions de température sont dues à l'ouverture d'un bouchon sur le couvercle du réacteur pour réaliser les prélèvements nécessaires à l'analyse des acides ascorbique et déshydroascorbique. Cependant, au vu des écart-types obtenus, les artefacts peuvent être considérés comme n'ayant aucune influence significative sur la température de réaction puisque les coefficients de variation n'excèdent pas 0,5%.

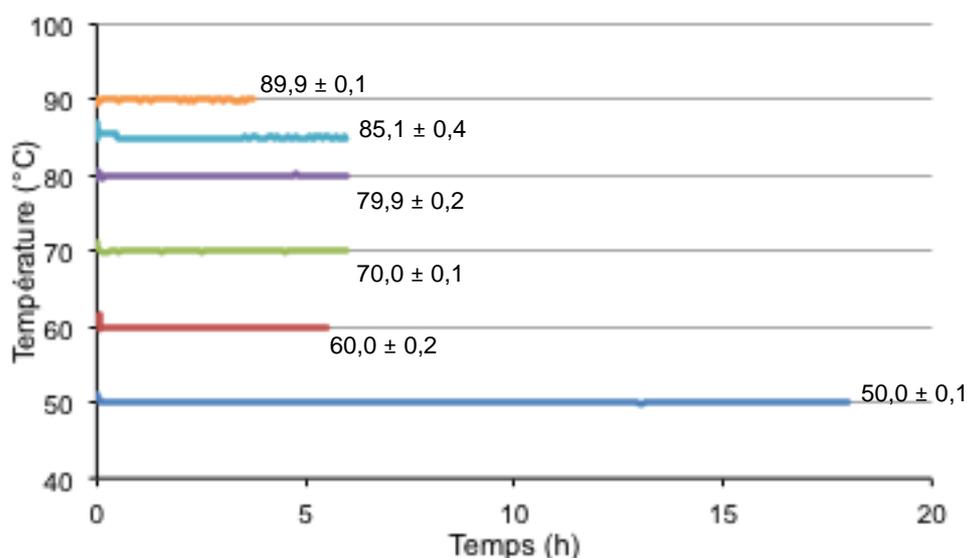


Figure 16. Maintien de la température pendant les cinétiques de dégradation ($n = 3$).

Le deuxième volet des performances du réacteur concerne sa capacité à atteindre et maintenir le niveau d'oxygène souhaité.

Pour vérifier la concentration en oxygène dans le réacteur, la pression partielle en oxygène est mesurée dans la solution et dans l'espace gazeux grâce à un oxymètre. Il s'agit d'un oxymètre Fibox 3LCD Trace v7 (PreSens, Regensburg, Allemagne) capable de mesurer la pression partielle en oxygène dans un liquide ou dans un mélange gazeux en fonction de la température. La détection se fait grâce à une fibre optique polymérique de 2,5 m de long et à des pastilles sensibles à l'oxygène de 5 mm de diamètre (capteurs) qui sont collées à l'intérieur du réacteur et du couvercle. Le principe de la mesure repose sur l'excitation de molécules photosensibles situées sur le support inerte (pastilles) par une source lumineuse bleue conduite via la fibre optique. La complexation entre le luminophore et l'oxygène conduit à la désactivation du signal de luminescence. L'appareil convertit le signal mesuré en valeur de pression partielle en oxygène et corrige cette valeur en fonction de la température jusqu'à 50 °C. Au-delà, l'appareil n'est plus capable de mesurer.

Du fait de l'impossibilité de mesure à des températures supérieures à 50 °C, la pression partielle en oxygène a été mesurée avant chaque démarrage de cinétique à 25 °C pour vérifier la cohérence entre la valeur mesurée et la consigne entrée dans le logiciel. Ensuite, le réacteur était mis en chauffe et la pression considérée comme constante tout au long de la cinétique. Le GasMix est annoncé comme permettant un mélange de gaz avec une incertitude sur les proportions < 2 %.

2.2.3 Protocole expérimental

Les cinétiques de dégradation de l'acide ascorbique ont été réalisées à différentes températures et différentes teneurs en oxygène (%O₂), dans une solution tampon malate 20 mM pH = 3,8 ; avec une concentration initiale en acide ascorbique dans le réacteur de 5,6 mM (1 g/L). Les cinétiques ont été poursuivies jusqu'à la dégradation quasi-totale de l'AA

ou au moins jusqu'à une dégradation supérieure à 50% quand le temps de manipulation était trop long pour atteindre une dégradation totale. Les temps de prélèvement varient selon les différentes conditions de températures et teneurs en oxygène mais en général ils ont été pris aux temps de 0, 3, 30, 60, 90 et 120 min pendant les deux premières heures.

Les températures et teneurs en oxygène utilisées sont présentées dans le **Tableau 5**. Seulement deux cinétiques de dégradation de l'AA en anoxie et quelques cinétiques de dégradation du DHAA en anoxie ont pu également être réalisées.

Avant le lancement d'une cinétique, le réacteur est monté et équipé avec les outils nécessaires (sonde de température, réfrigérant, canule de prélèvement). Les équipements périphériques sont démarrés de manière à se stabiliser, à la bonne température pour le cryostat (-10 °C pour les cinétiques entre 70 et 90 °C et 5 °C pour celles à 50 et 60 °C), et aux bons débits et pourcentages d'oxygène (O₂) et d'azote (N₂) pour le GasMix.

Ensuite, le réacteur est rempli avec 95 mL de tampon malate et la consigne de température est réglée à 25 °C. L'agitation est lancée à 300 rpm et après 1 h de bullage, la pression partielle en oxygène est vérifiée à l'aide de l'oxymètre. Si elle correspond à la valeur demandée, la température est alors réglée à la consigne + 2 °C.

Lorsque la température est stable, l'expérience peut démarrer. Pour cela, la température est réajustée à la consigne et immédiatement après, 5 mL de solution mère d'AA à 20 g/L sont ajoutés dans le réacteur. Cette injection constitue le temps zéro de la cinétique.

Tableau 5. Conditions de températures et teneurs en oxygène utilisées pour réaliser les cinétiques de dégradation de l'AA. Les chiffres indiquent le nombre de répétitions réalisées.

Composé utilisé [X] ₀ = 5,6 mM	T °C % O ₂	50	60	70	80	85	90
		AA	30	3	3	3	2
	21	3	3	3	2	3	3
	10	3	0	3	3	3	0

	0	0	0	0	1	0	1
DHAA	0	2	0	2	0	0	2

2.2.4 Détermination de la concentration en oxygène dans le réacteur

La détermination de la concentration en oxygène en moles est basée sur la loi de Henry (Eq. 16) qui établit que solubilité d'un gaz dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle qu'exerce ce gaz sur le liquide.

$$C_s = p_i * H_i \quad (16)$$

Où : C_s est la concentration maximale (dite « à saturation ») en mg/L, p_i est la pression partielle du gaz dans l'atmosphère (en Pa), et H_i est la constante de Henry qui dépend de la nature du gaz, de la température, et du liquide (en mg/L/Pa) .

Grâce au tableau de Winkler (annexe 1) donnant la solubilité de l'oxygène dans l'eau ($[O_2]$) aux conditions atmosphériques (21% d' O_2) pour une gamme de température de 0 à 100 °C, il a été possible de calculer la constante de la loi de Henry pour chaque température en utilisant les équations 17 et 18. Ensuite ces mêmes constantes de Henry ont été utilisées pour calculer les concentrations en oxygène correspondant aux autres pourcentages (10 et 30%) et ce pour chaque température (Eq. 17 et 18).

$$[O_2] = p_{O_2} * H_{O_2} \quad (17)$$

$$p_{O_2} = (\%O_2/100) * 1 \text{ atm} \quad (18)$$

2.2.5 Prise en compte du volume d'eau évaporé au cours des cinétiques

Une correction pour toutes les données expérimentales a été réalisée de manière à prendre en compte le volume évaporé pendant les cinétiques de dégradation et ainsi connaître la vraie valeur de la concentration en AA au cours du temps. En effet, l'évaporation parasite les résultats mesurés, les présentant plus élevés qu'ils ne le seraient si aucune évaporation n'avait eu lieu (concentration des réactifs et produits liée à la perte en eau).

Ce qui nous intéresse est de connaître la vraie concentration en acide ascorbique à chaque temps de prélèvement. Afin d'effectuer la correction, il faut tout d'abord calculer le volume total évaporé. Pour cela, nous décomposons le volume initial du réacteur (V_0) en différentes fractions : le volume final dans le réacteur (V_f), le volume prélevé (V_p) et le volume évaporé (V_{ep}). Le volume total prélevé est fonction du nombre de prélèvements (1,5 mL par prélèvement), il peut être facilement calculé. Ainsi le volume total évaporé peut être connu (Eq. 19).

$$V_{ep} = V_0 - V_f - V_p \quad (19)$$

En faisant l'hypothèse que le volume évaporé est une fonction linéaire du temps (hypothèse probable vu que le réacteur fonctionne en régime permanent) et comme le volume prélevé est fonction du nombre de prélèvements, l'équation 19 peut être reformulée pour calculer le volume dans le réacteur à chaque temps de prélèvement (V_f^t) (Eq. 20).

$$V_f^t = V_0 - (V_{ep})_t - \sum_0^{t-1} V_p \quad (20)$$

Une fois que le volume dans le réacteur pour chaque temps de prélèvement est calculé, il est nécessaire de connaître la masse d'AA correspondant à la concentration en acide ascorbique directement déterminée à partir du prélèvement ($[AA]_C$) (Eq. 21).

$$m_t = [AA]_C * V_f^t * M_{AA} \quad (21)$$

M_{AA} est la masse molaire de l'acide ascorbique et m_t est la masse d'acide ascorbique présente dans le réacteur au temps (t). Finalement la concentration corrigée en acide ascorbique à chaque temps de prélèvement est donnée par l'équation 22 :

$$[AA] = \frac{m_t}{(V_0 - \sum_0^{t-1} V_p) * M_{AA}} \quad (22)$$

2.3 Modèles

2.3.1 Régressions linéaires

Les régressions linéaires ont été ajustées par le logiciel Microsoft Excel® selon la méthode des moindres carrés, qui consiste à minimiser la somme des carrés des écarts (SCE) entre les valeurs mesurées (y) et les valeurs prédites (\hat{y}) (Eq. 23).

$$SCE = \sum_1^n ((y_i - \hat{y}_i)^2) \quad (23)$$

La qualité de l'ajustement du modèle sur les points expérimentaux a été caractérisée par le coefficient de détermination R^2 , qui traduit une corrélation d'autant plus forte que sa valeur est proche de 1.

2.3.2 Modèles cinétiques simples

Les modèles dits « simples » sont ceux pour lesquels une solution analytique existe pour l'expression de la concentration en analyte en fonction du temps ($[AA] = f(t)$ ou $[DHAA] = f(t)$). Ils ont été traités avec Microsoft Excel®. Le Solver a été utilisé afin d'identifier certains paramètres du modèle via la minimisation de la somme des carrés des écarts entre les valeurs expérimentales et les prédictions. Ensuite, une macro complémentaire appelée « SolverAid » a été utilisée pour le calcul des écart-types sur les paramètres identifiés et sur l'ajustement (caractérisé par la SCE) (de Levie, 2012). Cette macro est libre de droits et téléchargeable sur : <http://www.bowdoin.edu/~rdelevie/excellaneous/#downloads>

2.3.3 Modèles cinétiques complexes

Les modèles dits « complexes » sont ceux pour lesquels aucune solution analytique ne peut être trouvée pour la description de la concentration en analyte en fonction du temps et qui requièrent donc de travailler avec les équations différentielles $\left(\frac{d[AA]}{dt} \text{ ou } \frac{d[DHAA]}{dt}\right)$. Ils ont été traités avec Matlab® (Mathworks, Natick, Massachusetts, Etats-Unis). Le solveur « ode15s » a été utilisé pour la résolution des équations différentielles et la fonction de

minimisation « fminsearch » a servi pour l'identification des différents paramètres sur un critère de minimisation de la somme des carrés des écarts.

2.3.4 Caractérisation de l'ajustement des modèles

L'ajustement des modèles peut-être caractérisé par la somme des carrés des écarts entre les valeurs mesurées et prédites. Cependant, cette SCE dépend du nombre de données comparées et de la valeur de ces données, elle ne peut donc pas être comparée d'un modèle à l'autre. Afin de palier à cet inconvénient, l'ajustement des modèles a été préférentiellement caractérisé par l'erreur quadratique moyenne relative (*EQMR*) ou *root mean square error (RMSE)* en anglais qui, en ramenant la SCE au nombre de valeurs prédites (n) et à la moyenne de ces valeurs \bar{y} , peut s'apparenter à un coefficient de variation (Eq. 24).

$$EQMR = \frac{1}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum_1^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (24)$$

Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

Les résultats de ce travail sont organisés en deux parties constituées chacune d'un ou deux articles scientifiques (en cours de soumission) accompagnés de résultats préliminaires. La première partie détaille la validation de la méthode analytique utilisée tout au long de l'étude pour quantifier les acides ascorbique (AA) et déshydroascorbique (DHAA). La deuxième partie présente quant à elle les résultats des cinétiques expérimentales de dégradation de la vitamine C, au travers de ses deux constituants (AA et DHAA), ainsi que sa simulation avec un modèle d'abord simple et apparent puis multi-réponse et stœchiométrique.

3.1 Quantification des acides ascorbique et déshydroascorbique

L'importance d'avoir une méthode qui soit capable de doser de manière rapide l'acide ascorbique pour l'obtention de données cinétiques nous a amené à regarder les différentes méthodes existantes, comme par exemple celles utilisant la spectrophotométrie, la chromatographie liquide, la titrimétrie ou l'électrochimie.

Parmi toutes ces méthodes, les méthodes spectrophotométriques semblent suffisamment précises et rapides pour répondre à l'objectif. Ainsi, une première méthode spectrophotométrique appelée « Fer-Ortho-Test » a été sélectionnée au démarrage de la thèse pour mesurer l'acide ascorbique. En effet, cette méthode avait été validée par Pénicaud et al., (2010), pour un objectif de suivi cinétique qui pouvait paraître proche. Le principe de cette méthode est basé sur la réaction redox entre l'acide ascorbique et le Fe (III), donnant l'acide déshydroascorbique et Fe (II). Le Fe (II) est ensuite mis à réagir avec de la 1,1 O-phenanthroline, donnant un complexe $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ aussi appelé ferroïne qui présente une coloration orange mesurable par spectrophotométrie à 505 nm avec un signal proportionnel à la concentration en acide ascorbique dans l'échantillon.

Cette méthode a été mise au point au laboratoire et utilisée pour les premiers essais de cinétiques jusqu'à ce que ses limites apparaissent dans le cas de travail. En effet, l'utilisation de cette méthode de dosage requiert la préparation journalière d'un nombre

important de solutions, ce qui prend environ 4 heures, et nécessite également un temps de réaction de 2 heures. Ainsi, pour être capable de doser l'acide ascorbique, les cinétiques devaient se limiter à un temps maximum de 2 heures, ce qui s'est avéré trop court pour obtenir une dégradation suffisante de l'acide ascorbique (dégradation inférieure à 50% selon les cas). En effet, la définition d'un modèle réactionnel nécessite une dégradation d'au moins 70% (Van Boekel, 2009).

Par conséquent, une autre méthode a été choisie. Kalus & Filby, (1986) ont montré que l'acide ascorbique en solution aqueuse simple peut être mesuré directement par spectrophotométrie avec un pic d'absorbance situé aux alentours de 250 nm (selon le pH). Cette méthode en lecture directe permet de minimiser le nombre de préparation et d'obtenir des résultats plus rapides. Elle permet également d'envisager la mesure de l'acide déshydroascorbique pour peu qu'il ait été préalablement réduit en acide ascorbique. Cette méthode a été validée par une méthode statistique (Feinberg & Laurentie, 2010) afin de vérifier que ses performances sont en adéquation avec les objectifs de modélisation cinétiques envisagés.

3.1.1 Etudes préliminaires

3.1.1.1 Détermination du taux de dilution dans l'acide métaphosphorique permettant l'analyse par spectrophotométrie

Afin d'éviter toute dégradation de l'acide ascorbique avant analyse, l'acide métaphosphorique a été choisi pour ses propriétés stabilisantes démontrées dans la littérature (Chebrolu et al., 2012). Une étude préalable a permis d'identifier la dilution des solutions d'acide ascorbique dans l'acide métaphosphorique (AMP) permettant d'obtenir un signal suffisamment fort mais non saturé. Pour cela, différentes dilutions de la concentration maximale (6,81 mM) ont été testées (**Figure 17**).

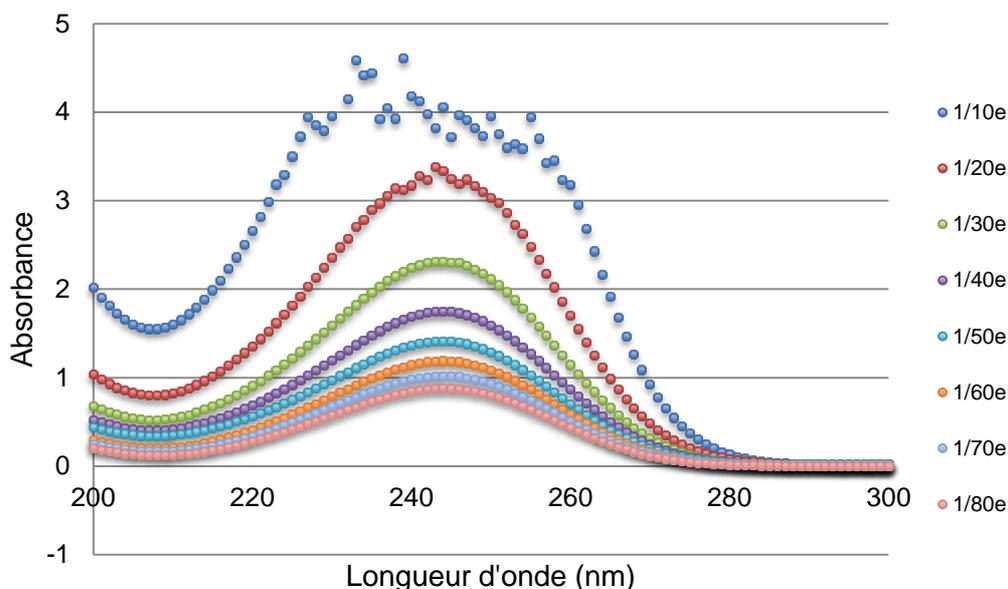


Figure 17. Spectre d'absorbance de l'acide ascorbique en fonction de la longueur d'onde pour une solution à 6,81 mM dans un tampon malate (20 mM, pH 3,8) diluée selon différents ratios par de l'acide métaphosphorique à 3%.

La dilution au 1/50^e a été retenue car c'est la dilution la plus faible permettant d'obtenir un signal d'absorbance non saturé. En regardant en détail les valeurs, on peut remarquer que la saturation du signal conduit à un déplacement de la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance est maximale (**Figure 17**). Cependant, ce déplacement est factice puisque lorsque le signal est saturé il est impossible de tenir compte des valeurs d'absorbance affichées. Donc pour toute la réalisation du travail de validation de la méthode, les solutions d'acide ascorbique ont été diluées au 1/50^e dans l'acide métaphosphorique 3%.

3.1.1.2 Détermination de la longueur d'onde correspondant au pic d'absorbance maximale de l'acide ascorbique

Une étude préalable consistant à réaliser des spectres d'absorbance de solutions d'acide ascorbique au 1/50^e dans l'AMP 3% ($n = 24$) a permis de déterminer la longueur d'onde pour laquelle était obtenue la valeur maximale d'absorbance de l'acide ascorbique.

Les pics obtenus ont tous présenté une absorbance maximale à une longueur d'onde de 243 nm, quelle que soit la concentration en acide ascorbique utilisée (**Figure 18**). Cette longueur d'onde a ainsi été retenue comme longueur d'onde de mesure pour la suite du travail.

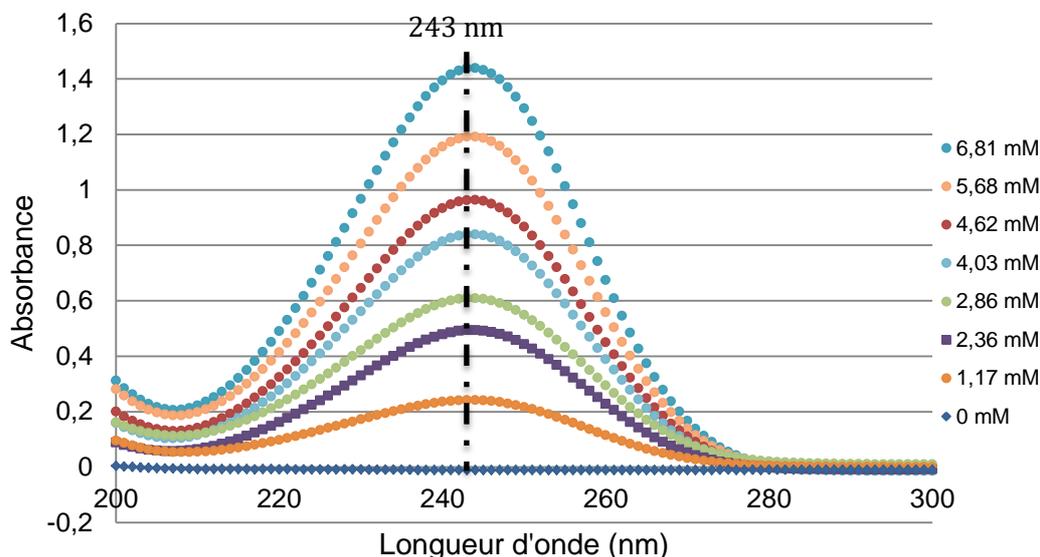


Figure 18. Absorbance de solutions d'acide ascorbique à différentes concentrations en fonction de la longueur d'onde.

3.1.1.3 Conversion complète du DHAA en AA

Afin de pouvoir doser l'acide déshydroascorbique (DHAA) avec la même méthode spectrophotométrique que l'acide ascorbique (AA), il est nécessaire de réduire le DHAA en AA grâce à un composé chimique réducteur, le DL-Dithiothréitol (DTT) (Louarme & Billaud, 2012). Cependant pour être sûr d'avoir une conversion complète du DHAA en AA certaines expériences ont été faites pour tester : le volume des solutions utilisées pour la réduction du DHAA en AA (première étape de la méthode), le temps de stockage dans un bain de glace, et le type et le temps d'agitation pour l'extraction avec l'acétate d'éthyle. Les résultats de ces expériences sont présentés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Effet de différents paramètres de la méthode sur le taux de conversion du DHAA en AA

Proportion des solutions pour la réduction (mL)			Temps de réaction (min)	Temps d'agitation (s)		[DHAA] _{pesée} (mM)	[DHAA] _{exp} (mM) (n = 3)	Taux de conversion (%)
				Vortex	rotatif			
Echantillon	DTT	Tampon tris						
			30	60	-	5,698	5,411	95,0
1	0,5	1	30	30	30	5,698	5,632	98,9
			45	30	30	5,698	5,496	96,5
			30	15	60	5,709	5,393	94,5
1	0,5	1	30	-	60	5,721	5,371	93,9
0,5	0,5	1	30	-	60	5,721	5,67	99,1

[DHAA]_{pesée} : Concentration en DHAA de référence obtenue par pesée

[DHAA]_{exp} : Concentration en DHAA obtenue après conversion de l'absorbance selon la gamme étalon moyenne obtenue précédemment pour l'acide ascorbique

Taux de conversion : rapport entre la concentration en DHAA mesurée ([DHAA]_{exp}) et la concentration en DHAA de référence ([DHAA]_{pesée})

En accord avec les résultats obtenus, le dernier jeu de proportion de solutions utilisées a été retenu, à savoir un mélange réactionnel contenant 0,5 mL d'échantillon, 0,5 mL de solution de DTT et 1 mL de tampon Tris (soit une quantité de DTT de 5,3 moles pour 1 mole de DHAA) avec une extraction du DTT après réaction réalisée avec une agitation par retournement du mélange réactionnel additionné de 5 mL d'acétate d'éthyle pendant 1 min pour chacune des 3 extractions.

3.1.1.4 Impact de l'ajout des solutions nécessaires à la réduction du DHAA en AA sur le spectre d'absorbances obtenu

Le dosage du DHAA nécessite l'ajout dans le mélange réactionnel de plusieurs réactifs qui peuvent interférer sur le spectre d'absorbance obtenu lors de la mesure spectrophotométrique. Effectivement, au moment de comparer le spectre avant et après

réduction, un décalage dans les absorbances a été constaté pour les faibles longueurs d'ondes, sans que cela paraisse impacter la valeur d'absorbance obtenue à la longueur d'onde de mesure (243 nm). Cependant, pour expliquer le décalage dans la mesure d'absorbance, une étude a été faite pour étudier séparément les solutions utilisées dans la méthode de dosage du DHAA. Pour cela, les réactifs ont été testés séparément en gardant toutefois les proportions des solutions pour l'étape de réduction du DHAA en AA préalablement définies et en remplaçant les réactifs qui ne sont pas testés par du tampon malate (**Figure 19**). La dilution finale à 1/50 dans une solution d'AMP 3% est normalement réalisée avant la mesure.

Les résultats de la **Figure 19** permettent de mettre en évidence quels sont les réactifs qui provoquent la modification du spectre des absorbances. Par contre, ils montrent que certains produits, notamment le DTT et l'acétate d'éthyle, provoquent une forte augmentation des absorbances aux faibles longueurs d'onde qui pourrait avoir un effet sur l'absorbance lue à 243 nm lors de la mesure de l'acide ascorbique. La présence de ces réactifs explique probablement la nécessité d'utiliser un facteur de correction lors de la mesure du DHAA.

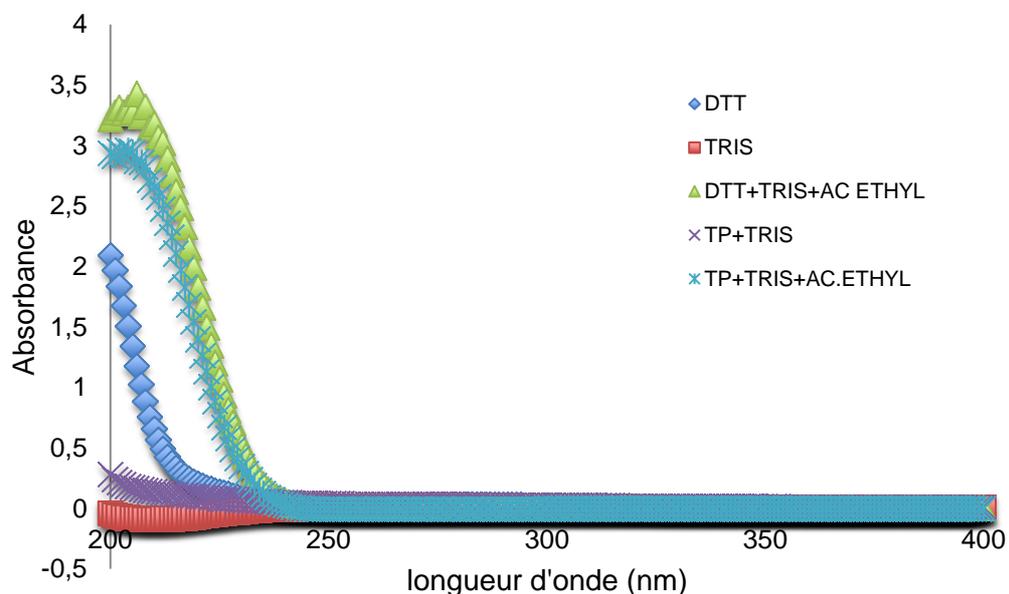


Figure 19. Balayage spectral des solutions présentes dans le dosage du DHAA, mesurées de manière séparé. DTT = solution de dithiothreitol (30 mM), TRIS = solution tris HCl (0,2 M, pH 8,2), TP = solution phosphate (0,1 M, pH 7,5) et AE = Acétate d'éthyle (Extraction)

3.1.2 Validation de la méthode

L'article qui suit vise à présenter la validation de la méthode de dosage par spectrophotométrie pour les acides ascorbique et déshydroascorbique. En accord avec l'objectif, il est primordial que la méthode soit rapide, simple, fidèle et juste pour l'obtention de données cinétiques de dégradation à différentes températures et concentrations en oxygène.

Publication 1. Spectrophotometric method for fast quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in simple matrix for kinetic measurements

Braulio Gómez Ruiz, Stéphanie Roux*, Francis Courtois, Catherine Bonazzi

UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inra, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 69 93 50 99; fax: +33 (0)1 69 93 50 20.

Complete postal address: AgroParisTech, UMR GENIAL, 1 avenue des Olympiades, F-91744 Massy Cedex, France.

E-mail address: stephanie.roux@agroparistech.fr

Other authors e-mail addresses: braulio.gomezruiz@agroparistech.fr,
francis.courtois@agroparistech.fr, catherine.bonazzi@agroparistech.fr

Abbreviated title

Spectrometric quantification of ascorbic and dehydroascorbic acids

Abstract

A simple, rapid and reliable method was developed for quantifying ascorbic (AA) and dehydroascorbic acid (DHAA) and validated in 20 mM malate buffer (pH 3.8). It consists in a spectrophotometric measurement of AA, either directly on the solution added with metaphosphoric acid or after reduction of DHAA into AA by dithiothreitol. This method was developed with real time measurement of reactions kinetics in bulk reactors in mind, and was checked in terms of linearity, limits of detection and quantification, fidelity and accuracy. The linearity was found satisfactory on the range of 0-6.95 mM with limits of detection and quantification of 0.236 mM and 0.467 mM, respectively. The method was found acceptable in terms of fidelity and accuracy with a coefficient of variation for repeatability and reproducibility below 6% for AA and below 15% for DHAA, and with a recovery range of 97-102% for AA and 88-112% for DHAA.

Key words: analytical method, validation, near-the-line fast measurement, food, vitamin C.

Chemical compounds studied in this article

Ascorbic acid (PubChem CID: 54670067); Dehydroascorbic acid (PubChem CID: 440667).

3.1.2.1 Introduction

Vitamin C is a nutrient essential for human diet with beneficial effects on health due to its primary defensive function of free-radical scavenger of reactive oxygen and nitrogen species. This vitamin is mainly found in fruit (e.g. citrus fruit , kiwis, mangos, red berries contain between 20 and 50 mg of vitamin C in 100 g of product) and vegetables (e.g. parsley, pepperroni, cabbage, broccoli and tomato contain between 40 and 200 mg of vitamin C per 100 g of product) (Amiot-Carlin et al., 2007; Domínguez-Perles et al., 2013; Liu et al., 2012; Park et al., 2015). The term vitamin C refers to compounds exhibiting the same full or partial biological activity as *L*-ascorbic acid (AA). It includes natural compounds such as AA

itself, but also synthetic compounds such as *D*-isoascorbic acid (also known as erythorbic acid) or ascorbyl palmitate (fat-soluble form of the vitamin C) (Ball, 2006; Eitenmiller et al., 2008). The dehydroascorbic acid (DHAA), which is the oxidized form of AA, exhibits *in vivo* a full vitamin C activity as it can be reduced to its AA form in the human body. Depending on the authors it can be explicitly included in the vitamin C group of compounds (Eitenmiller et al., 2008) or not (Ball, 2006) even if the definition of vitamin C remains the same for both authors. It is therefore important to measure both AA and DHAA for evaluating the total vitamin C content in a product (Barrett & Lloyd, 2012). AA is also often added as an antioxidant and anti-browning aid for processed food products containing fruit and vegetables, either for enrichment or fortification, or for protecting other nutrients (like phenolic compounds) from oxidation. In many studies, due to its high sensitiveness to applied conditions, it is used as an indicator in the perspective of estimating the retention of nutrients during processing of food. In fact, AA and DHAA are highly unstable at high temperature (Burdurlu et al., 2006; Laing et al., 1978; Lin & Agalloco, 1979; Oey et al., 2006; Rojas & Gerschenson, 1997a, 2001; Yuan & Chen, 1998), high pH (Rogers & Yacomeni, 1971; Wilson et al., 1995), light (Solomon & Svanberg, 1995), in presence of oxygen (Garcia-Torres et al., 2009; Solomon & Svanberg, 1995; Van Bree et al., 2012), and of traces of transition metals or of enzymes (Serpen & Gokmen, 2007).

Several papers reviewed the methods proposed for AA and/or DHAA quantification in food products. Many methods have been developed: titrimetry, photometry, polarometry, amperometry, thin layer chromatography, gas chromatography, and HPLC (Arya et al., 2000; Ball, 2006; Hasselmann & Diop, 1983). Recently, Pisoschi et al., (2014) also reviewed the potentialities and analytical performances of electrochemical methods for AA assessment in various media. The AOAC method for vitamin preparations and juices is a titrimetric method based on the reduction of the pink 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) with AA in an acid solution. It is a rapid, precise and low cost method, that can also be miniaturized on microplates prior to absorbance detection at 505 nm (Pénicaud et al., 2010), but interference with substances reacting with DCPIP can occur and DHAA does not participate to the redox

reaction (Ball, 2006). Arya et al., (2001) described the spectrophotometric methods for the determination of vitamin C in different substrates. All the methods they cited involved vitamin C reaction with a chemical compound either to produce or to consume a molecule easily measurable by spectrophotometry. A classical approach is based on the oxidation of AA to DHAA and its reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form osazone of diketogluconic acid, which yields a stable brown color with sulfuric acid with an absorption at 540 nm proportional to the total quantity of AA and DHAA (Ball, 2006).. Direct spectrophotometry is rarely used for the measurement in food extracts because of the spectral interferences with many substances. Chromatographic methods are the only ones that make it possible to separate AA from interfering substances present in food. AA can be detected directly by either absorbance or electrochemical detectors, or by mass spectrometry. In order to perform both AA and DHAA quantification using UV detection, the reduction of DHAA must be inserted in the method (Odriozola-Serrano et al., 2007; Takayanagi et al., 2009) or DHAA must be derivatized using 4,5-dimethyl-1,2-phenylenediamine prior to fluorescence detection (Nováková et al., 2008). HPLC methods are highly selective and generally more sensitive than spectrophotometric or titration methods. The current state of HPLC methods for simultaneous determination of AA and DHAA in food have been extensively reviewed by Nováková et al., (2008) and Spínola et al., (2014). UHPLC has also been recently applied to the analysis of vitamin C in foods, with shorter analysis times and much lower solvent consumption (Klimczak & Gliszczynska-Swiglo, 2015; Spínola et al., 2013). For his part, Deutsch, (2000) focused on DHAA and reviewed most quantification methods including crystallographic, infrared and ultraviolet studies, nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, electrochemical detection, and separation methods. LC-MS methods remain especially promising because of its short analysis time, as well as high sensitivity and selectivity. Szultka et al., (2014) demonstrated the feasibility of this technique for the determination of AA (with limit of quantification < 0.5 ng/mL) and the study of AA degradation products.

Direct UV spectrophotometry remains nevertheless an interesting option for rapid and inexpensive quantification of both AA and DHAA in solutions. AA has its absorption maximum in the range of 244-265 nm depending of the pH. DHAA in solution absorbs UV light well at 185 nm, but has little absorbance above 220 nm (Deutsch, 2000). Reduction must therefore be performed prior to measurement. Dithiothreitol (DTT) is the most common reducing agent (Esteve et al., 1997; Nováková et al., 2008; Takayanagi et al., 2009), but tris[2carboxylethyl]phosphine hydrochloride (TCEP), dimercaptopropanol (Chebrolu et al., 2012; Odriozola-Serrano et al., 2007), or cysteine (Chiari et al., 1993; Herrero-Martinez et al., 1998) may serve as alternatives. Odriozola-Serrano et al., (2007) obtained significantly better recovery values in fruit using DTT as reducing agent when compared to dimercaptopropanol. The content of DHAA is then calculated by subtracting the initial AA content from the total AA content after the conversion. This method has the disadvantage that reducing agents could interfere with the measurement and decrease the sensitivity of the method. However DHAA reduction is rapid (< 10 min), and thus makes it possible a rapid quantification of DHAA.

The reliability of a method is the prerequisite for a correct interpretation of analyses. All analytical methods require proper optimization and validation to ensure their suitability for further applications and to yield reliable results. Statistical methods must be used for providing acceptance criteria on the key elements necessary for validation: linearity, selectivity, accuracy, bias, precision, and lower limits of detection and quantification (Feinberg & Laurentie, 2010).

The aim of this work is to validate a method for the determination of AA and DHAA in buffer solutions by direct spectrophotometric absorbance using a proven and robust methodology proposed by (Feinberg & Laurentie, 2010). This method must be reliable, but as rapid and simple as possible in order to be used for measuring real time kinetics of AA and DHAA contents versus different heating and oxygenation conditions.

3.1.2.2 Materials and methods

3.1.2.2.1 Reagents

Ascorbic acid crystalline (AA) (99%), dehydroascorbic acid (DHAA) (99%), DL-dithiothreitol (DTT) (99%), and ethyl acetate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Malic acid, metaphosphoric acid, tris(hydroxymethyl) aminomethane, and sodium phosphate monobasic dihydrate were purchased from VWR Prolabo chemicals (Luther Worth, England). Sodium hydroxide (97%) and sodium phosphate dibasic dihydrate were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Water was purified through a Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) water system and used for all solutions preparations and dilutions.

3.1.2.2.2 Equipment

Measurements were performed on a UV-vis scanning spectrophotometer (SPECORD 210 Plus, Analytik Jena AG, Jena, Germany) in the 200 to 300 nm wavelength range, with a slot of 1 nm, a reading speed of 10 nm/s, and an integration time of 0.1 s.

3.1.2.2.3 Ascorbic and dehydroascorbic acids determination

All AA and DHAA solutions were prepared in 20 mM malate buffer (pH 3.8) on a daily basis.

3.1.2.2.3.1 Ascorbic acid determination

Ascorbic acid solutions were diluted to 1/50 (v/v) in an aqueous solution of 3% metaphosphoric acid (w/v) in order to avoid further oxidation. Chebrolu et al., (2012) recently confirmed that AA was stable up to 48 h in metaphosphoric acid extracts at room temperature. The absorbance of the mixture was recorded against a 20 mM malate buffer diluted 1/50 in metaphosphoric acid, and read at 243 nm, wavelength for which AA exhibited the maximum absorbance (**Figure 20**). The absorbance value was then converted into AA concentration using a calibration curve obtained the same day.

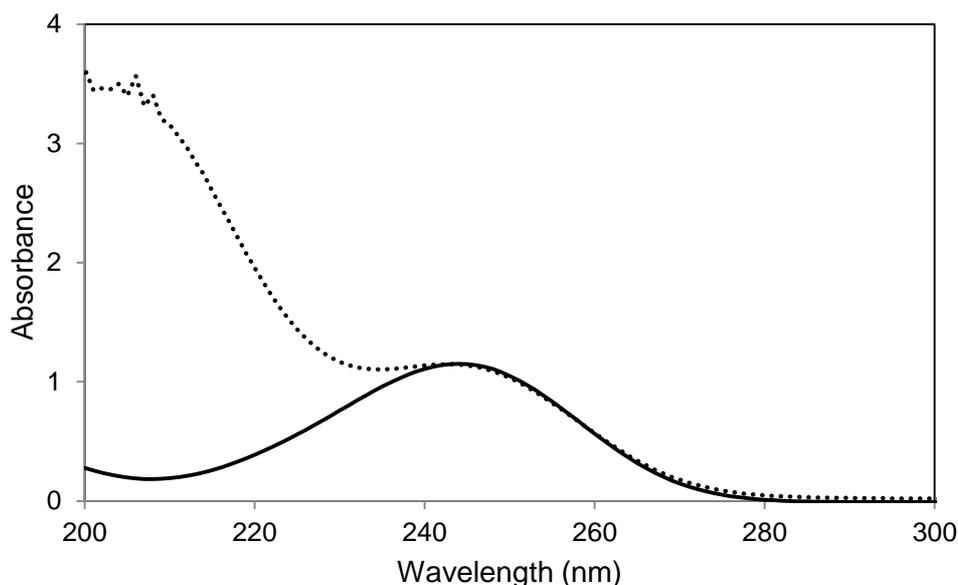


Figure 20. Absorbance spectra recorded on AA (—) and DHAA converted into AA (- -) solutions prepared in 20 mM malate buffer diluted at 1/50 in a 3% metaphosphoric acid solution (w/v).

3.1.2.2.3.2 Dehydroascorbic acid determination

The method is based on the reduction of DHAA into AA, so as to use the same methodology as for the analysis of native AA. The reduction method consisted in mixing 0.5 mL of sample with 0.5 mL of 30 mM DTT solution prepared in 0.1 mM phosphate buffer (pH 7.5) and 1 mL of 0.2 M tris HCl buffer (pH 8.2). The mixture was homogenized using a vortex, then placed in an ice bath, and kept dark for 30 min. After 30 min of reaction, DTT in excess was eliminated by three successive extractions with ethyl acetate immiscible with malate buffer (stirring by rotation for 1 min each time to promote contact between the phases), and AA concentration was determined as previously described. The wavelength exhibiting the maximum absorbance was the same as for pure AA and the absorbance value was not affected by the added reagents, demonstrating a good selectivity (**Figure 20**). The value read at 243 nm (A_{total}) was then converted into total AA content using the calibration curve. A first DHAA content, called $[\text{DHAA}]_{\text{bc}}$ (before correction), was determined by calculating the difference between the total AA content and the initial AA content measured

on the sample prior to reduction. A correction (see below) was then applied to obtain the true DHAA content, called [DHAA].

3.1.2.2.4 Calibration and validation plans

The calibration and validation plans for the quantification of AA and DHAA contents were based on guidelines proposed by Feinberg & Laurentie, (2010), defining the number of experiments necessary to achieve meaningful statistics (**Tableau 7**).

3.1.2.2.5 Tools for method validation

The reliability of the method was validated with regards to its linearity, limits of detection, fidelity, and accuracy.

Tableau 7. Calibration and validation plans used for the quantification of AA and DHAA contents

	Calibration plan (Number of experiments)	Validation plan (Number of experiments)			
	AA	AA	DHAA		
			TC* = 5.6	TC = 4	TC = 1.5
I = series (new set of experiments)	4	4	3	3	3
K = levels of concentration	5	4	7	5	5
J = replication par level	3	3	3	3	3
Total number of experiments	60	48	63	45	45

*TC = total concentration.

3.1.2.2.5.1 Linearity

In the present method, AA content ([AA]) is deduced from an indirect measurement (absorbance recorded at 243 nm: $A_{243 \text{ nm}}$) requiring a calibration. As AA contents are supposed to vary in the range of 0 - 5.6 mM in further experiments, linearity was checked over a larger range of 0 - 6.95 mM. Five standard solutions evenly distributed over the

concentration range (*i.e.* 0, 0.58, 2.37, 4.63, and 6.95 mM, respectively) were used in 12 repetitions (4 series of 3 replicates). The linearity was expressed using l'équation 25.

$$A_{243\text{ nm}} = a_1 \times [\text{AA}] + a_0 \quad (25)$$

where a_1 was the fitted slope, also called sensitivity, and a_0 the intercept.

The linear model was fitted using the method of least-squares, and the adequacy of the fit was tested using a procedure of analysis of variances (ANOVA) (Feinberg & Laurentie, 2010).

Experimental Fisher values (F -values) were compared to their tabulated values ($F_{\alpha; DoF1; DoF2}$) for the selected significance level (α) and for 2 degrees of freedom, $DoF1$ for the linear regression and $DoF2$ for residual errors. In our case, α was set either to 0.01, $DoF1 = 1$ (for the linearity test) or $p-2$ (for the nonlinearity test), and $DoF2 = N - p$ (with N the total number of measurements and p the number of levels (or tested solutions)). F -values were calculated from the analysis of variances (Feinberg & Laurentie, 2010). Linearity was tested by comparing the experimental Fischer value for linearity (F_l) to its tabulated value. For $F_l > F_{0.01; 1; N-p}$, the calculated regression can be accepted. On the same way, non-linearity was tested by comparing the experimental Fischer value for non-linearity (F_{nl}) to its tabulated value. For $F_{nl} \leq F_{0.01; p-2; N-p}$, the linear regression gives an accurate description on the whole range of content values. If $F_{nl} > F_{0.01; p-2; N-p}$, the calibration curve is not linear over the selected range and its size must be reconsidered.

3.1.2.2.5.2 Limit of detection / limit of quantification

The limit of detection (LOD) is the lowest concentration likely to be reliably distinguished from a blank and at which detection is feasible. The limit of quantification (LOQ) is the lowest concentration at which the product can not only be reliably detected, but measured with a sufficient and/or defined degree of confidence. LOD and LOQ at a 95% confidence level were calculated from the parameters a_1 and a_0 (Eq. 25) :

$$LOD = \frac{a_0 + 3s_{a0}}{a_1} \quad (26)$$

$$LOQ = \frac{a_0 + 10s_{a0}}{a_1} \quad (27)$$

where s_{a0} is the standard deviation of the blank signal (the intercept).

3.1.2.2.5.3 Fidelity

The fidelity of the method is characterized by the repeatability I and the reproducibility I. The repeatability is the maximum deviation at a 95% confidence level between two results obtained during a single analytical run (same experimenter, same set of solutions, and same day). The reproducibility is the maximum deviation at a 95% confidence level between two within-laboratory measurements obtained at different times (different days) and that may involve different analysts, equipment, or reagents. An analysis of variance for a single random effect model was used to determine the repeatability and reproducibility. The coefficients of variation for repeatability (CV_T) and for reproducibility (CV_R) were calculated as the ratios of standard deviation of replicates to mean of replicates, according to Feinberg & Laurentie, (2010).

3.1.2.2.5.4 Accuracy

The accuracy of a method characterizes the difference between the experimentally measured and true values, and is expressed in the form of an absolute bias (i.e. difference between the theoretical and the measured mean concentration) and a percent recovery (ratio of the measured concentration to the theoretical one $\times 100$). A method can be considered accurate if the recovery is in the range of $100 \pm 15\%$ (Shah et al., 1992).

3.1.2.2.5.5 Correction factor

A correction factor can be applied if a systematic bias is observed on the measured values. The methodology consists in expressing first the linear correlation between the measured and the reference values. If the slope is not equal to 1 as expected, it will correspond to an average percent recovery, and the intercept will correspond to a systematic bias. Two correction factors can then be calculated: 1/slope, used to correct the unsatisfactory percent recovery, and the intercept, used to correct the systematic bias. The concentration can be calculated as (Eq. 28) :

$$[X]_{\text{final}} = \left([X]_{\text{bc}} \times \frac{1}{m} \right) - Int \quad (28)$$

where $[X]_{\text{bc}}$ is the concentration measured (before correction), m the slope of the linear dependence between the actual concentrations measured and the reference values, and Int the intercept of the new regression line according to concentrations corrected with m versus reference values.

3.1.2.3 Results and discussion

3.1.2.3.1 Calibration of ascorbic acid concentration from absorbance measured at 243 nm

Figure 21 shows the repetitions of absorbance measured for each level of concentration plotted against the average value of AA content for each level, as calculated from actual mass (reference). A linear regression analysis was applied, and the adequacy of the linear regression model was tested. Results obtained for the linearity test, the equation calculated for the calibration line, and the limits of detection and quantification are given in **Tableau 8**. Considering these statistical results, the fitted linear regression model is acceptable (linearity test), and the model is linear over the full range 0 - 0.695 mM (nonlinearity test). As shown in Table 2, LOD is 0.236 mM, and LOQ is 0.467 mM.

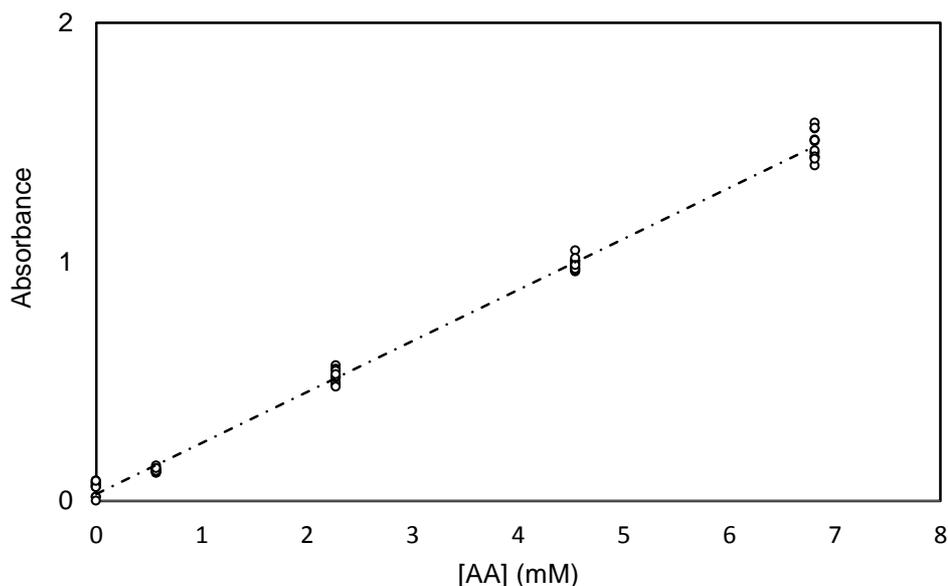


Figure 21. Calibration curve for ascorbic acid quantification using absorbance measured at 243 nm

3.1.2.3.2 Validation of the quantification of ascorbic acid

Tableau 9 shows the results obtained for the validation of the quantification of ascorbic acid contents. The concentrations were calculated from the absorbance by applying the calibration lines made during the same series.

Tableau 8. Statistical results to assess the adequacy of the linear regression model for the calibration curve

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Variance	F calculated	F tabulated ($p = 0.01$)	Conclusion
Linearity	7.235	1	7.23497	93852	7.770	Satisfactory
Nonlinearity	0.0002	3	0.00007	0.879	4.675	Satisfactory
Residual	0.0019	25	0.00008			
Total	7.2371	29				

Calibration curve	
Model	
Slope (a_1)	0.2135
Intercept (a_0)	0.0292
R^2	0.9956
s_{a0}	0.0071

Limits of detection and quantification.	
Limit of detection (<i>LOD</i> , in mM)	0.236
Limit of quantification (<i>LOQ</i> , in mM)	0.467

Tableau 9. Measured and predicted values for the validation of AA content analysis

Levels	Series	[AA] from weighted mass (mM)	[AA] from absorbance measured at 243 nm (triplicates) (mM)		
			1	2	3
A	1	1.167	1.16	1.19	0.98
	2	1.145	1.24	1.20	1.17
	3	1.170	0.98	1.05	1.02
	4	1.167	1.07	1.14	1.1
B	1	2.907	2.82	2.93	2.93
	2	2.907	2.88	2.78	2.74
	3	2.918	2.77	2.88	2.8
	4	2.907	2.76	2.86	2.79
C	1	4.065	4.06	4.04	3.97
	2	4.043	4.02	4.04	3.97
	3	4.043	3.94	4.01	4.06
	4	4.065	3.86	3.93	3.98
D	1	5.882	5.74	5.73	5.73
	2	5.803	5.84	5.77	5.68
	3	5.871	5.88	5.98	5.98
	4	5.882	5.70	5.79	5.80

These experimental results made it possible to calculate the fidelity and the accuracy of the method for each level of concentration (**Tableau 10**). This method is characterized by coefficients of variation (*CV*) for repeatability and for reproducibility below 3%, except for the lower concentration of 1.162 mM for which *CV* values of 5.72% and 8.36% were calculated for repeatability and reproducibility, respectively. However the method was considered validated in terms of fidelity on the whole range because the precision around the mean values never exceeded 10% of variation. The method was also considered accurate because all the values obtained were close to the reference value, with a maximal absolute bias of -0.08 mM and a mean percent of recovery of 97.5%. Nevertheless all the biases were slightly

negative, indicating that the true values were slightly underestimated by this measurement method.

Tableau 10. Values calculated for evaluating the precision of ascorbic acid analysis

Levels	Average [AA] from weighted mass (mM)	Average measured [AA] (mM)	Fidelity		Accuracy	
			CV _r (%)	CV _R (%)	Absolute Bias	Recovery (%)
A	1.16 ± 0.01	1.10 ± 0.09	5.72	8.36	-0.05	95.4
B	2.91 ± 0.01	2.83 ± 0.07	2.18	2.40	-0.08	97.3
C	4.05 ± 0.01	3.99 ± 0.06	1.26	1.49	-0.06	98.3
D	5.86 ± 0.04	5.80 ± 0.1	0.90	1.90	-0.06	99.0

3.1.2.3.3 Validation of the quantification of dehydroascorbic acid

3.1.2.3.3.1 Correction of the DHAA concentration as a function of the total absorbance measured at 243 nm

Series of measurements were made on different solutions containing mixtures of AA and DHAA in different proportions, and for 3 levels of total content in AA + DHAA (**Tableau 11**).

Results on **Figure 22A** show that the direct application of the calibration line fitted for AA to absorbance values measured on the solutions before and after reduction of DHAA did not make it possible to calculate, by difference, the correct concentrations in DHAA, if compared to the mass weighted for the preparation of the solutions. An average percent recovery significantly different from 100%, and a systematic bias depending on the total content in AA + DHAA were observed. The methodology proposed by Feinberg & Laurentie, (2010) for correcting the values, the equation 28 was applied in order to obtain a unique regression model for calculating DHAA contents whatever the total content in AA + DHAA in the range of 0 - 5.6 mM.

Results plotted on **Figure 22A** show that the fitted slopes of the linear regression models calculated for each series corresponding to a total content in AA + DHAA were relatively close. A new linear regression model was built taking as unique slope, for all concentrations, the mean value of the 3 previous slopes ($\bar{m} = 0.7524$) (**Figure 22B**).

In order to increase the percent recovery and have a slope of regression line equal to 1, calculated concentrations of DHAA were corrected by multiplying the data by the inverse of this average slope, resulting in modified intercepts for each regression line (**Figure 22C**).

These new intercept values varied with the total content in AA + DHAA, and therefore with the total absorbance measured after reduction (A_{total}). A new regression model was built in order to be able to predict (Eq. 30) the intercept value (Int) as a function of A_{total} (**Figure 23**).

Figure 22D shows the agreement between the corrected values for DHAA content and the direct proportionality line. The equation for correcting DHAA concentration value is determined from the equation 25 as follows:

$$[DHA] = \left([DHA]_{bc} \times \frac{1}{\bar{m}} \right) - Int = \left([DHA]_{bc} \times \frac{1}{0.7524} \right) - (1.014 \times A_{total} + 0.1529) \quad (29)$$

where $[DHAA]_{bc}$ is the concentration of DHAA before correction, determined by difference between the total AA content and the AA content measured on the sample prior to reduction, and $[DHAA]$ is the final value of concentration after correction taking the total content in AA + DHAA into account .

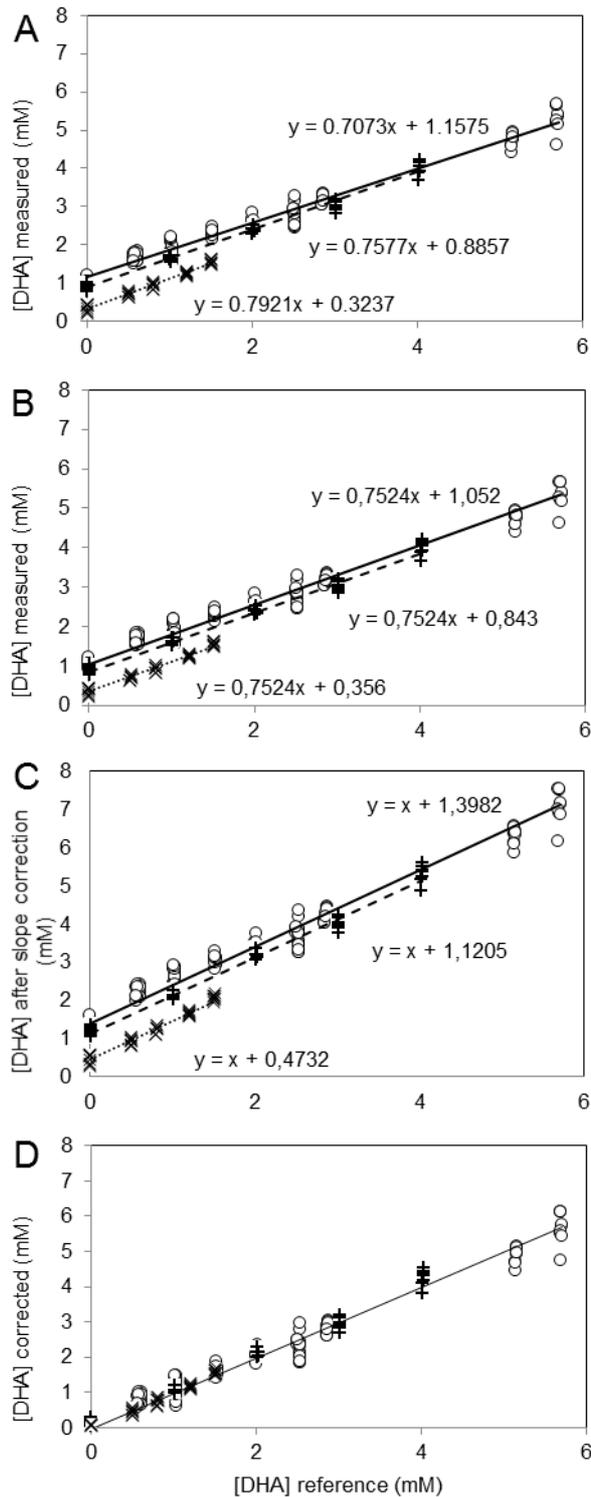


Figure 22. Correction of DHAA content values as a function of the total concentration in AA + DHAA: (A) raw values from absorbance measured at 243 nm when applying the calibration regression model calculated for AA; (B) linear regression models fitted with the same unique slope for all total concentrations in AA + DHAA; (C) linear regression models corrected in order to have a slope equal to 1; (D) DHAA values corrected by the intercept calculated as a function of the total absorbance (A_{total}). “o” for [AA + DHAA] = 5.6 mM; “+” for [AA + DHAA] = 4 mM; “x” for [AA + DHAA] = 1.5 mM.

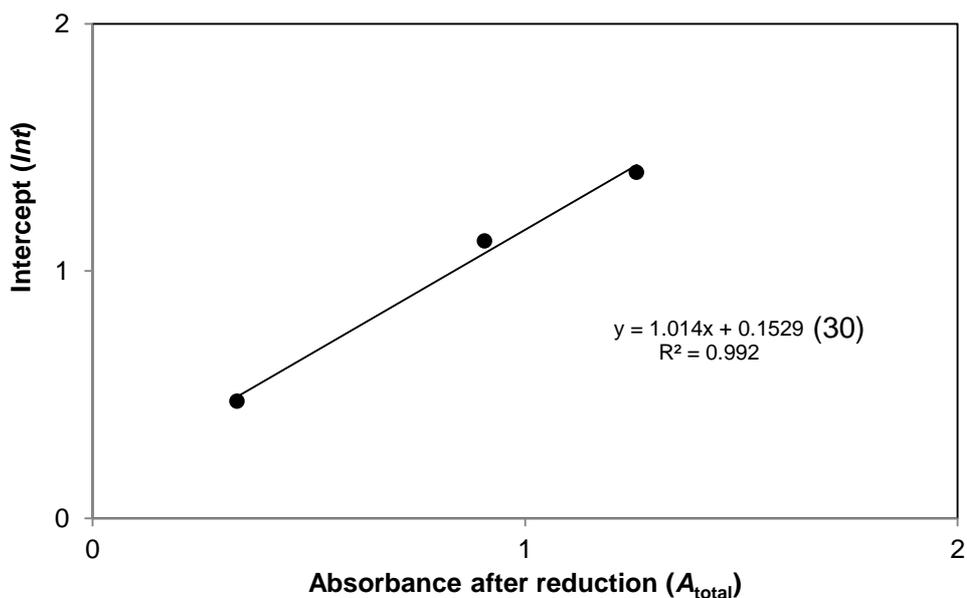


Figure 23. Regression linear model for predicting the intercept value as a function of total absorbance at 243 nm recorded after reduction by DTT.

3.1.2.3.3.2 Validation plan

Tableau 11 shows all the experimental results on the plan used to validate the quantification of DHAA content.

Tableau 12 shows the values characterizing the fidelity of the method. All the coefficients of variation are below 15%, except for repeatability at 1.02 mM ($CV_r = 16.12\%$), and for reproducibility at concentrations in the range of 0 - 1.02 mM ($12 < CV_R < 21\%$). It is a classical observation that repeatability and reproducibility are lower for concentrations near the *LOQ*, because the reducing agents tend to interfere with the measurement (Moeslinger, Brunner, & Spieckermeann, 1994). All the values obtained are close to the true value, with a maximal absolute bias in the range of 0.01 - 0.28 mM (in absolute value) and a percent recovery of $100 \pm 13\%$, except for a concentration level of 0.6 mM. The method was therefore considered accurate.

Tableau 11. Experimental measured data and predicted values for the validation of DHAA content analysis

Levels	Series	Concentrations calculated from weighted mass (mM)		[AA] from absorbance measured at 243 nm (n = 3) (mM)	[DHAA] from absorbance measured at 243 nm and corrected (mM)		
		[AA]	[DHAA]		1	2	3
A	1	5.695	0	5.58	-0.04	0.10	-0.03
	2	5.689	0	5.63	0.15	0.18	-0.03
	3	5.695	0	5.63	-0.20	-0.10	-0.05
B	4	1.003	0.502	0.98	0.34	0.35	0.34
	5	1.091	0.505	1.07	0.54	0.44	0.46
	7	1.003	0.504	0.98	0.56	0.47	0.49
C	1	5.127	0.574	5.13	0.50	0.56	0.41
	2	5.127	0.580	5.06	0.73	0.79	0.71
	3	5.119	0.570	5.16	0.70	0.32	0.44
	10	5.133	0.609	5.30	1.01	0.90	0.93
	11	5.139	0.620	5.39	0.68	0.79	0.68
	12	5.139	0.609	5.39	0.71	0.69	0.64
D	4	0.702	0.802	0.66	0.62	0.63	0.63
	5	0.705	0.806	0.75	0.86	0.79	0.75
	6	0.702	0.805	0.67	0.87	0.80	0.79
E	1	4.713	1.034	4.76	0.84	1.29	1.25
	2	4.701	1.028	4.66	0.68	1.15	1.34
	3	4.702	1.022	4.68	0.85	1.24	1.36
	7	3.009	1.008	2.96	0.98	1.04	1.02
	8	3.018	1.011	3.06	1.07	1.20	1.21
	9	3.012	1.002	2.99	1.07	1.20	1.21
F	4	0.301	1.205	0.28	1.09	1.14	1.13
	5	0.308	1.207	0.36	1.23	1.16	1.13
	6	0.308	1.210	0.28	1.26	1.20	1.19
G	1	4.190	1.552	4.22	1.50	1.70	1.66
	2	4.201	1.528	4.20	1.41	1.56	1.70
	3	4.182	1.522	4.12	1.66	1.86	1.73
	4	0	1.502	-0.04	1.48	1.64	1.63
	5	0	1.507	0.02	1.56	1.52	1.52
	6	0	1.516	-0.02	1.64	1.57	1.71
H	1	3.742	2.010	3.72	2.06	1.95	1.73
	2	3.690	2.010	3.82	1.93	1.84	2.31
	3	3.690	2.022	3.65	1.96	1.91	2.06
	7	2.033	2.027	1.97	2.06	2.00	2.13
	8	2.021	2.004	2.09	2.13	2.15	1.99
	9	2.004	2.010	2.00	2.29	2.29	2.14
I	1	3.291	2.510	3.35	2.10	2.09	2.33
	2	3.180	2.527	3.24	2.42	2.76	2.95
	3	3.191	2.510	3.27	2.34	2.47	2.50
	10	3.219	2.527	3.28	2.42	2.01	2.31
	11	3.219	2.527	3.29	2.12	2.33	2.03
	12	3.219	2.527	3.30	1.83	1.84	1.89
J	1	2.884	2.855	2.92	2.68	2.63	2.63
	2	2.862	2.872	2.93	3.10	3.06	3.04
	3	2.884	2.860	3.03	2.75	2.93	2.81
K	7	1.016	3.007	1.05	2.71	2.83	2.90
	8	1.014	3.010	1.06	3.15	3.13	3.15
	9	1.011	3.010	1.05	2.97	3.18	3.11
L	7	0	4.015	0.15	3.82	4.11	4.12
	8	0	4.026	0.06	4.33	4.53	4.32
	9	0	4.026	0.06	4.17	4.44	4.34
M	1	0.591	5.146	0.64	4.69	5.00	4.96
	2	0.591	5.152	0.64	5.51	5.28	5.47
	3	0.573	5.163	0.80	5.36	5.23	5.30
N	1	0	5.766	0.16	5.70	5.76	5.44
	2	0	5.686	0.13	4.73	5.57	6.11
	3	0	5.686	0.07	5.48	6.09	6.11

Tableau 12. Values calculated for evaluating the precision of dehydroascorbic acid analysis

Levels	Average [DHAA] calculated from weighed mass (mM)	Average measured [DHAA] (mM)	Fidelity		Accuracy	
			CV_r (%)	CV_R (%)	Absolute Bias	Recovery (%)
A	0	0.04 ± 0.13	-	-	0.04	-
B	0.504 ± 0.002	0.44 ± 0.08	9.27	21.38	-0.06	88.2
C	0.594 ± 0.021	0.68 ± 0.18	11.11	17.95	0.19	131.6
D	0.804 ± 0.002	0.75 ± 0.10	5.70	15.3	-0.06	93.1
E	1.018 ± 0.012	1.15 ± 0.18	16.12	17.08	0.13	112.7
F	1.210 ± 0,003	1.17 ± 0.05	3.28	11.98	-0.04	96.7
G	1.521 ± 0.018	1.61 ± 0.14	6.09	6.90	0.08	105.2
H	2.014 ± 0.009	2.08 ± 0.13	6.03	6.51	0.07	103.5
I	2.521 ± 0.009	2.26 ± 0.31	7.42	14.13	-0.26	89.7
J	2.862 ± 0.009	2.80 ± 0.17	1.81	6.79	-0.06	97.9
K	3.009 ± 0.002	3.00 ± 0.17	2.77	6.23	0.01	100.2
L	4.022 ± 0.006	4.24 ± 0.21	3.42	5.44	0.22	105.5
M	5.154 ± 0.009	4.87 ± 0.24	1.82	6.79	-0.28	94.6
N	5.713 ± 0.046	5.67 ± 0.44	8.21	7.73	-0.04	99.3

3.1.2.4 Conclusion

Both methods for measuring AA and DHAA contents were acceptable in terms of fidelity and accuracy, with a percent recovery varying between 95 and 99% for AA, and between 88 and 132% for DHAA. The coefficient of variation for repeatability and reproducibility were good and below 9% for AA. The CV values for DHAA analysis were significantly higher, due to interferences with chemicals produced during the reduction by DTT prior to spectrophotometric recording. Repeatability and reproducibility could nevertheless be considered acceptable with coefficients of variation below 15% in the range of 0 - 5.67 mM for repeatability and of 0.8 - 5.67 mM for reproducibility, respectively. Both methods made it possible a fast and reliable quantification of AA content (in about 5 min) and of DHAA content (in about 35 min, including the 30 min of waiting time for the reduction of DHAA in AA) in aqueous solutions, and are therefore totally appropriate for following reaction kinetics on buffer solutions in agitated reactors.

Acknowledgements

We would like to thank the CONACyT for the funding of the doctoral fellowship of Braulio Gómez Ruiz.

3.1.3 Conclusion

L'étape de validation de la méthode a montré qu'elle est acceptable en termes de fidélité et de justesse, avec un coefficient de variation inférieur à 9% pour l'AA et inférieur à 15% pour le DHAA dans la gamme de concentration utilisée, et avec un recouvrement entre 95 et 99% pour l'AA et entre 88 et 132% pour le DHAA.

La méthode de dosage des acides ascorbique et déshydroascorbique de manière directe par spectrophotométrie, permet une quantification fiable et rapide : environ 5 min pour l'AA, et environ 35 min pour le DHAA (dont 30 min dans un bain de glace).

Cette méthode est donc considérée comme appropriée pour une utilisation dans le cadre de l'obtention de données cinétiques en temps réel au cours d'un traitement thermique.

3.2 Cinétiques de dégradation de la vitamine C

Les expériences réalisées sont des cinétiques de dégradation de la vitamine C à différentes températures et concentrations en oxygène dissous dans un milieu simple liquide. Les données ont été obtenues en mesurant l'évolution des concentrations en acides ascorbique et déshydroascorbique, en partant d'une solution initiale contenant uniquement l'un des deux composés à une concentration de 5.6 mM.

Les expériences à partir d'AA ont été réalisées pour 6 niveaux de températures (50, 60, 70, 80, 85 et 90 °C) et 3 teneurs en oxygène dissous réglées sous forme de pourcentage d'oxygène dans le gaz de bullage (10, 21 et 30%), avec minimum 2 répétitions pour chaque couple de réglages. Par ailleurs deux cinétiques en anoxie (0% d'oxygène, balayage à l'azote) ont été réalisées, l'une à 85 °C et l'autre à 90 °C.

Quant aux expériences à partir de DHAA, elles ont été réalisées sur 3 niveaux de températures (50, 70 et 90 °C) en anoxie (0% d'oxygène) avec deux répétitions pour chaque réglage.

3.2.1 Etudes préliminaires

3.2.1.1 Effet de la concentration initiale en acide ascorbique

Une étude a été réalisée pour évaluer l'effet de la concentration initiale en acide ascorbique sur la vitesse de réaction. Pour cela une cinétique a été réalisée avec une concentration initiale double de celle classiquement utilisée (**Figure 24**).

Après standardisation des concentrations (division de la concentration par la concentration initiale), les résultats obtenus ont permis de montrer que l'augmentation de la concentration initiale en AA n'a aucun effet sur la vitesse de dégradation de l'AA. Ceci confirme que les constantes de vitesses qui seront obtenues par la suite lors de la mise en place des modèles seront bien indépendantes de la concentration en réactif, comme cela doit être.

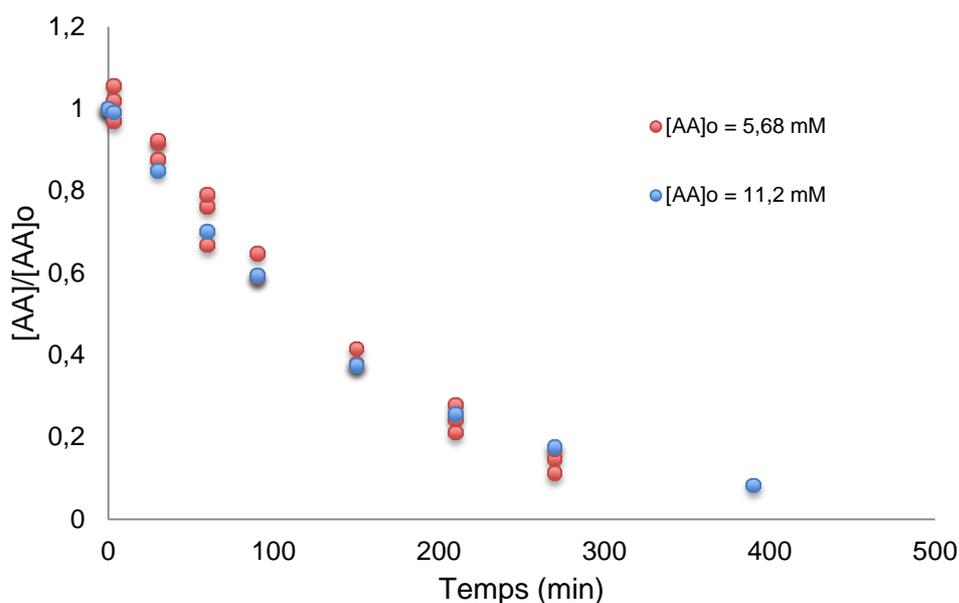


Figure 24. Effet de l'augmentation de la concentration initiale en AA sur la cinétique de dégradation à 70 °C et 21% O₂.

3.2.1.2 Effet du pH

Le pH d'expérimentation a été fixé à 3,8 afin de correspondre à celui des fruits, notamment la pomme, dans lesquels la vitamine C est nativement présente. Cependant, afin de mesurer l'impact d'un changement de pH sur la vitesse de dégradation de l'acide ascorbique, une cinétique a été réalisée pour un pH de 5,5 au lieu des 3,8 utilisés dans le reste des expériences (**Figure 25**).

Comme attendu, les résultats montrent une modification très importante de la cinétique de dégradation lorsque le pH est modifié avec une accélération de la vitesse de réaction lorsque le pH augmente. Ces résultats sont conformes à ce qui avait été précédemment montré par (Rojas & Gerschenson, 1997b; Wilson et al., 1995).

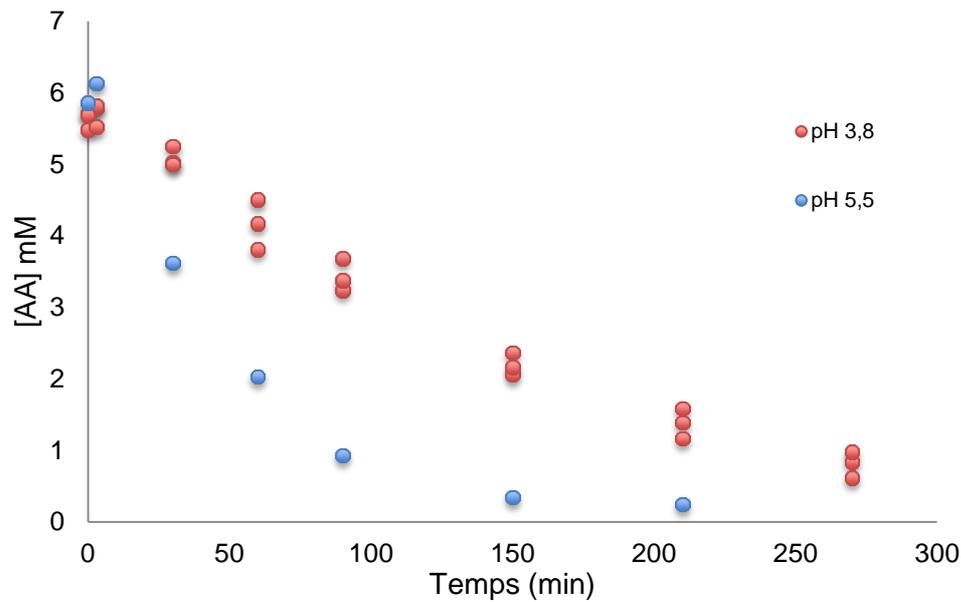


Figure 25. Effet du pH sur la dégradation de l'AA à 70 °C et 21% d'O₂.

3.2.2 Dégradation de la vitamine C et modélisation

Le chapitre ci-après est divisé en 2 parties, correspondant à 2 articles (en cours de soumission à Food Chemistry). La première partie présente les résultats concernant l'acide ascorbique et leur simulation par un modèle simple apparent. La deuxième partie présente les résultats concernant le DHAA et décrit un modèle plus complexe impliquant 4 réactions et utilisant une résolution multi réponses.

3.2.2.1 Modélisation simple des concentrations en acide ascorbique

Publication 2. Degradation kinetics of vitamin C at different temperatures and concentrations of dissolved oxygen in a model solution

1. Simple modeling of ascorbic acid concentration

Braulio Gómez Ruiz, Stéphanie Roux*, Francis Courtois, Catherine Bonazzi

UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inra, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 69 93 50 99; fax: +33 (0)1 69 93 50 20.

Complete postal address: AgroParisTech, UMR1145 GENIAL, 1 avenue des Olympiades, F-91744 Massy cedex, France.

E-mail address: stephanie.roux@agroparistech.fr

Other authors e-mail addresses: braulio.gomezruiz@agroparistech.fr,
francis.courtois@agroparistech.fr, catherine.bonazzi@agroparistech.fr

Abbreviated title: Kinetic modeling of vitamin C degradation, a simple model

Abstract

Kinetics of vitamin C degradation were acquired in controlled conditions of temperature (50 - 90 °C) and oxygen partial pressures (10 - 30%) thanks to a specific reactor able to maintain both parameters during several hours. The degradation of vitamin C in a simple aqueous solution composed by malate buffer (20 mM, pH 3.8) was assessed by taking samples regularly and quantifying spectrophotometrically the ascorbic acid content at 243 nm. Results showed that ascorbic acid degradation increases with temperature and oxygen concentration. A simple model was successfully developed to simulate the experimental data by a first order reaction and an apparent kinetic rate constant. This constant was function of the temperature and the oxygen concentration. To try to separate the effects, the model was then implemented including the oxygen stoichiometry and it was

demonstrated that data are not sufficient to identify both the kinetic rate constant and the stoichiometric coefficient.

Key words: ascorbic acid, oxygen, first order reaction model

Highlights

- Ascorbic acid degradation increases with temperature and oxygen concentration
- A simple first order apparent model enables to describe the experimental data
- The apparent kinetic rate constants are function of temperature and oxygen
- Separating temperature and oxygen effects needs to use the oxygen stoichiometry
- Oxygen stoichiometric coefficient and kinetic rate constant are linked

Chemical compound studied in this article:

Ascorbic acid (PubChem CID: 54670067).

3.2.2.1.1 Introduction

Most fresh fruits and vegetables contain high levels of vitamin C which is of particular importance for human health. Vitamin C has many well established biological functions essential to enzymatic and cellular metabolisms. Deficiency of vitamin C slows down the activity of several enzyme systems involved in the synthesis of collagen and causes scurvy (Institute-of-Medicine, 2000; Patil et al., 2009; Shashirekha et al., 2015). More globally vitamin C acts as an anti-oxidant, having a potentially protective role against cardiovascular diseases and some cancers (Block, 1991; Frei et al., 2012; Patil et al., 2009).

For nutritional purposes, vitamin C refers to the sum of *L*-ascorbic acid (AA, the reduced form), and dehydroascorbic acid (DHAA, the oxidized form) (Barrett & Lloyd, 2012). AA is a rather unstable compound which degradation highly depends of environmental conditions as pH (Golubitskil et al., 2007; Van den Broeck et al., 1998; Wilson et al., 1995;

Yuan & Chen, 1998), temperature (Blaug & Hajratwala, 1972; Oey et al., 2006; Rojas & Gerschenson, 1997b; Vernin et al., 1998), light (Tikekar et al., 2011; Yang & Min, 2009), oxygen (Dhuique-Mayer et al., 2007; Eison-Perchonok & Downes, 1982; Van Bree et al., 2012) and metallic catalysts. In general, AA is more stable at low pH (< pK₁ = 4.17) in its undissociated form, for it is the ascorbate ion which oxidizes in the presence of oxygen. Reaction pathways also differ depending on aerobic/anaerobic conditions (Gregory, 1985). At high temperature, in anaerobic conditions, AA can be degraded to furfural, with formation of 3-deoxy-*L*-pentosone as an intermediate (Kurata & Sakurai, 1967; Louarme & Billaud, 2012; Vernin et al., 1998). In aerobic conditions, AA is oxidized into DHAA, which is unstable in aqueous media, and is then hydrolyzed to 2,3-diketogulonic acid (Szultka et al., 2014). This latter is very unstable and it will be rapidly degraded to many products, among which 3-hydroxy-2-pyrone and 2-furoic acid have been identified (Bradshaw et al., 2011; Yuan & Chen, 1998).

In most studies, degradation kinetics are modeled by means of apparent reaction models of zero-order (Laing et al., 1978), first-order (Burdurlu et al., 2006), pseudo-first order (Patkai et al., 2002; Uddin et al., 2002), or second-order (Eison-Perchonok & Downes, 1982; Singh et al., 1976) These models are well described in (Van Boekel, 2008). The 1st-order reaction is the most frequently reported, considering only AA as a reactant (pseudo-1st-order), with the temperature dependence described using the Arrhenius' law, and identified E_a values in the range of 20 - 130 kJ/mol (Bosch et al., 2013; Devahastin & Niamnuy, 2010; Lešková et al., 2006). Due to the strong correlation between E_a and the pre-exponential coefficient, Van Boekel, (2008) and Peleg et al., (2012) recommend to reparameterize the Arrhenius equation by introducing a reference temperature T_{ref} , so that the pseudo-1st-order rate constant k could be expressed as $\frac{k}{k_{ref}} = \exp\left[-\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]$. Another approach consists in considering empirical models like the Weibull equation fitted to experimental kinetics. It was successfully applied to AA degradation during drying of pre-treated tomatoes (Marfil et al., 2008b) or during storage of orange juices at 20 - 45 °C (Manso et al., 2001). In

this latter study, such a model was more predictable for longer times (> 30 h) than a 1st-order reaction. Few papers consider the role of oxygen as a reactant. Pénicaud, (2009) studied AA degradation in aqueous solutions for different temperatures (8 - 33 °C) and oxygen concentrations (0 - 21%), and fitted the kinetics using a reaction model of 1st-order for AA and β -order for oxygen. Identified β values varied between 0.6 and 1.6 versus temperature.

The aim of this work is to describe the impact of temperature and dissolved oxygen concentration on ascorbic acid degradation in order to further build a simple predictive model, first apparent and then taking into account the oxygen stoichiometry.

3.2.2.1.2 Materials and methods

3.2.2.1.2.1 Reagents

Crystalline ascorbic acid (AA) (99%), was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USE). Malic acid and metaphosphoric acid (40-50%) were purchased from VWR Prolabo chemicals (Luther Worth, England). Sodium hydroxide (97%) was purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Water was purified through a Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) water system and used for all solutions preparations and dilutions.

3.2.2.1.2.2 Equipment

The degradation kinetics were carried out in a laboratory reactor system EasyMaxTM 102 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland), composed by a thermostatic bloc which allows the regulation of the temperature between -28 and 183 °C (± 1 °C) and in which are placed the 2 glass reactors (100 mL). The reactors are protected from light. Each reactor is equipped with a temperature sensor in platinum (Pt100), a steam condenser and a magnetic stirring (set at 300 rpm). The temperature control is carried out via the on-line measurement of the temperature of the reactor contents. The reactor is operated via iControl EasyMax®4.1. The entire system is cooled by a continuous cryostat (NESLAB RTE 300, Newington, USA) to condense the vapors emitted and avoid the loss of volume in the reactor during the degradation kinetics. To limit the condensation in the system a flow

circulation of nitrogen is used to prevent damage to the electrical instrument. Finally, the reactor system is coupled with a gas mixer GaxMix (AlyTech, Juvisy-sur-Orge, France) capable to supply and maintain the desired oxygen concentration in the reactor during the kinetics.

The performance of the reactor was evaluated taking into account its ability to achieve and maintain the temperature for a chosen period of time. The temperature value (measured by the Pt100 probes present in each of the reactors) has been calibrated with a certified oven (WIKA CTD 91000-450 N°581003, Klingenberg, Germany) for the range of temperatures studied (50 to 90 °C). The constancy of the temperature along time was assessed by calculating the variation coefficient over 3 kinetics for each temperature (18 h for 50 °C, 6 h for 60, 70, 80, 85 °C and 4 h for 90 °C) with a temperature recording every 2 seconds. The coefficients of variation found did not exceed 0.5% showing no significant variation of the temperature during the kinetics.

The oxygen concentration supplied by the GasMix was verified measuring the oxygen partial pressure in the solution and in the headspace with an oxygen-meter Fibox 3LCD Trace V7 (PreSens, Regensburg, Germany). However, as this device is limited to provide measures for temperatures below 50 °C, the oxygen partial pressures were measured at 25 °C before heating the reactor. The GasMix is advertised as allowing a gas mixture with an accuracy of $\pm 2\%$.

3.2.2.1.2.3 *Kinetics assays*

The degradation kinetics of ascorbic acid were achieved at 6 different temperatures (50, 60, 70, 80, 85 and 90 °C) and at 3 different oxygen concentrations dissolved in the liquid system (10, 21 and 30% in partial pressure). Each kinetic was repeated 3 times.

The initial concentration of ascorbic acid in the reactor was the same for all the experiments (5.6 mM or 1 g/L). This was provided with the addition of 5 mL of a mother solution of ascorbic acid (112 mM or 20 g/L) to 95 mL of malate buffer 20 mM at pH 3.8 (adjusted with a

sodium hydroxide solution 5 M). Before the addition of AA solution the malate buffer was preheated at temperature of interest and equilibrated at the chosen oxygen partial pressure for at least 30 min.

The kinetics were done until sufficient degradation of ascorbic acid. Samples of 1.5 mL were regularly taken for the determination of AA.

3.2.2.1.2.4 Ascorbic acid determination

The samples were diluted to 1/50 (v/v) in a solution of 3% metaphosphoric acid (w/v). The absorbance of the mixture at 243 nm (A) was then recorded against a 20 mM malate buffer diluted to 1/50 in metaphosphoric acid using a UV-vis scanning spectrophotometer (SPECORD210 Plus, Analytik Jena AG, Jena, Germany). A previous validation of this method was done for a concentration range between 0 and 6.95 mM with accuracy and fidelity acceptable with a cover 95-99% and coefficient variation $CV < 9\%$ for the repeatability and reproducibility. The linearity test of the calibration range (0 - 6.95 mM) was acceptable with a coefficient of determination $R^2 = 0.9993$ and with limit of detection and quantification of 0.235 and 0.467 mM respectively (Gomez-Ruiz, Roux, Courtois, & Bonazzi, submitted). A first concentration in ascorbic acid ($[AA]_{bc}$) was then calculated using the calibration curve ($A = 0.2135 \times [AA]_{bc} + 0.0292$).

The ascorbic acid concentration was corrected in order to take into account the water evaporation occurring in the reactor during the kinetics (Eq. 31). To do so, the volume of the batch without evaporation is calculated (knowing the initial and sampled volumes, evaporation can be calculated) and used to re-calculate the true value of ascorbic acid concentration.

$$[AA]_t = \frac{[AA]_{bc} \cdot (V_0 - (V_e)_t - \sum_0^{t-1} V_s)}{(V_0 - \sum_0^{t-1} V_s)} \quad (31)$$

where $[AA]_t$ is the true concentration in ascorbic acid at time t , $[AA]_{bc}$ is the concentration before correction calculated directly from the calibration curve, V_0 is the initial volume of the

reactor, $(V_e)_t$ is the evaporated volume at time t and $\sum_0^{t-1} V_s$ is the cumulated sampled volume till time $t-1$.

3.2.2.1.2.5 Dissolved oxygen concentration determination

The determination of the oxygen concentration dissolved in the liquid medium is based on Henry's law (Eq. 32). This equation links the partial pressure in oxygen calculated from the oxygen percentage (Eq. 33) and the Henry's constant (H_{O_2}). Winckler's table gives oxygen concentration for 21% oxygen and different temperature (Winkler, 1888). It enables calculating H_{O_2} by using equation 32. Then, as H_{O_2} is only dependent on temperature, any other percentage of oxygen can be treated using the previously determined H_{O_2} values in Eqs. 32 and 33.

$$[O_2] = \frac{p_{O_2} \cdot H_{O_2}}{M_{O_2}} \quad (32)$$

$$p_{O_2} = \frac{\%O_2}{100} * P_{atm} \quad (33)$$

where $[O_2]$ is the saturation concentration of oxygen in a liquid medium (M), p_{O_2} the partial pressure of oxygen in the atmosphere (Pa), H_{O_2} is the Henry's constant, which depends of the nature of the gas, the temperature and the liquid (g/L/Pa), M_{O_2} is the molecular mass of oxygen (g/mol), $\%O_2$ the percentage of oxygen and P_{atm} the atmospheric pressure (Pa).

3.2.2.1.2.6 Data treatment tools

Data were treated using Microsoft Excel®. The solver was used to determine the unknown parameters of the models by minimizing the sum of the squares (SS) between experimental and predicted data (Eq. 34)

$$SS = \sum_1^n ((y_i - \hat{y}_i)^2) \quad (34)$$

where y_i are the experimental values and \hat{y}_i the predicted values.

Then, the relative root mean square error (*RMSE*) was used to evaluate the quality of fittings (Eq. 35).

$$RMSE = \frac{1}{\bar{\hat{y}}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_1^n ((y_i - \hat{y}_i)^2)}{n}} \quad (35)$$

where $\bar{\hat{y}}$ is the mean of the predicted values and n the number of predicted values.

The response surfaces were obtained using Matlab® (Mathworks, Natwick, Massachussets, USA).

3.2.2.1.3 Results and discussion

3.2.2.1.3.1 Ascorbic acid degradation kinetics

Ascorbic acid degradation kinetics (**Figure 26**) show an exponential behavior coherent with a first order reaction classically described in literature. The repeatability of the experiments, evaluated by comparing visually the superposition of the 3 sets of data acquired for each experimental condition, is quite good. But the direct comparison of serials of data acquired during separate experiments, as for each kinetic in this case, lead to interpretation mistakes due to a difference in AA initial contents whose are impossible to measure in real conditions because of the time needed to let the reactor homogenize after the AA introduction at $t = 0$. This factor has been further corrected by calculating the ratio between AA concentration at any time and at the initial time ($[AA]/[AA]_0$).

As expected, temperature seems to have an enhancing effect on the degradation reaction as the time needed to obtain a same level of ascorbic acid reduction became shorter when the temperature increases. The conclusion is less clear concerning the oxygen, as increasing its partial pressure seems to have no effect on AA degradation at low temperatures (50 and 60 °C) but a significant one at higher temperatures (70 to 90 °C) leading to lower remaining ascorbic acid concentrations. This behavior was not observed by previous authors (Pénicaud, Bohuon, Peyron, Gontard, & Guillard, 2012, Eison-Perchonok & Downes, 1982).

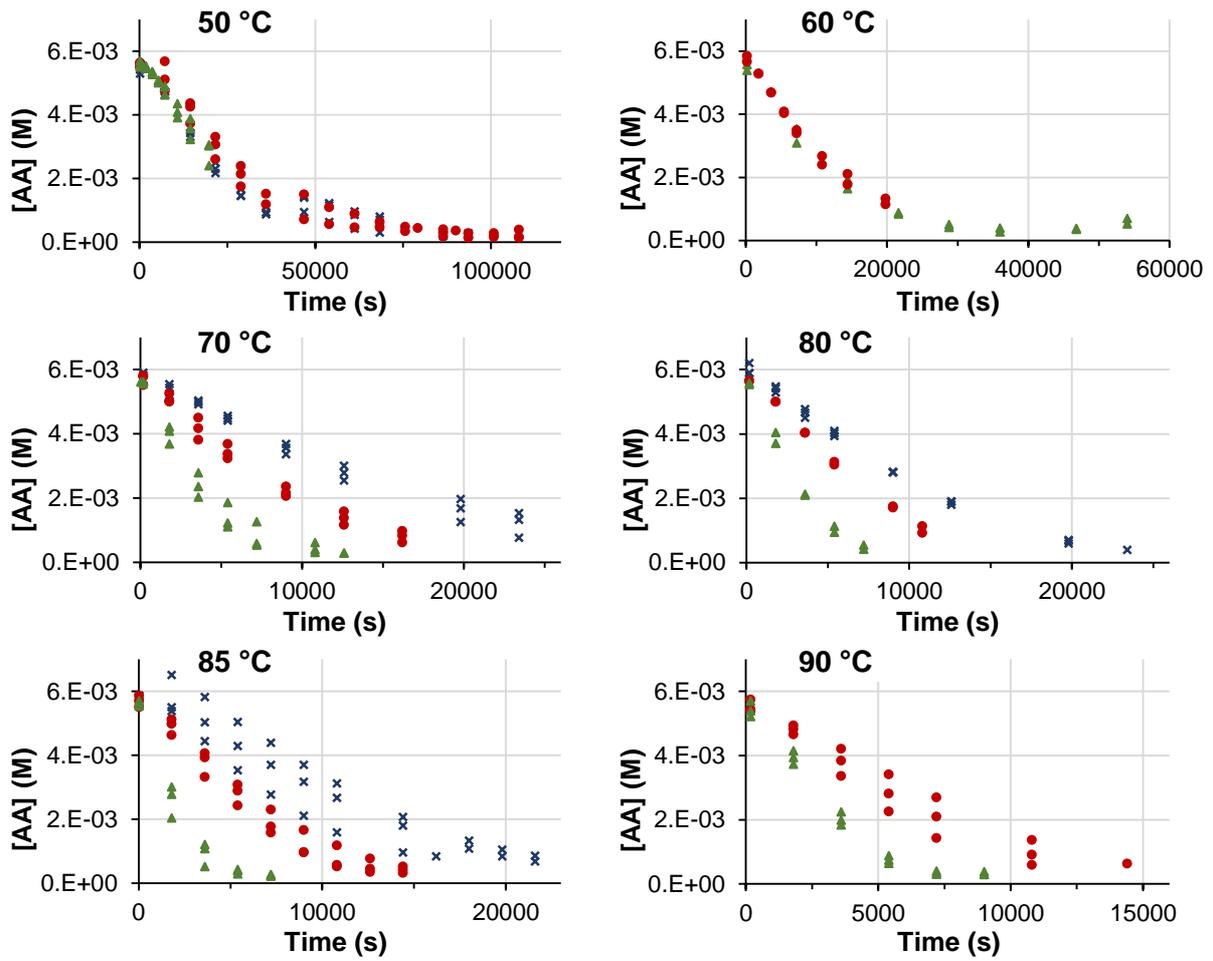


Figure 26. Kinetics of ascorbic acid degradation for 6 temperatures and 3 partial pressures of oxygen: \times , 10%; \bullet , 21%; \blacktriangle , 30% ($n = 3$).

3.2.2.1.3.2 Simple apparent model for ascorbic acid degradation

First order kinetic modelling (Eq. 36) was applied to the experimental data (**Tableau 13**).

$$[AA] = [AA]_0 \cdot \exp(-k_{app} \cdot t) \quad (36)$$

Tableau 13. First order kinetic modeling (Eq. 36) of ascorbic acid degradation

T (°C)	PP O ₂		Model on raw data			Model on standardized data	
			[AA] ₀	k_{app}	RMSE	([AA]/[AA] ₀) ₀ (+/- s.d.)	RMSE
			k_{app} (+/- s.d.) (s ⁻¹)				
50	10%	1	5.71E-03	4.15E-05	14.3	1.00 +/- 0.03	16.7
		2	5.52E-03	3.66E-05	18.2	3.77E-05 +/- 1.74E-06	
		3	5.72E-03	3.50E-05	14.1		
50	21%	1	6.42E-03	3.47E-05	20.9	1.00 +/- 0.02	15.8
		2	5.68E-03	3.39E-05	13.7	3.40E-05 +/- 1.40E-06	
		3	6.06E-03	3.32E-05	12.1		
50	30%	1	5.92E-03	3.70E-05	5.4	1.00 +/- 0.02	5.1
		2	5.90E-03	3.60E-05	3.6	3.38E-05 +/- 2.03E-06	
		3	5.81E-03	2.87E-05	3.2		
60	21%	1	5.55E-03	7.35E-05	13.7	1.00 +/- 0.03	16.4
		2	5.63E-03	8.35E-05	16.2	7.17E-05 +/- 3.70E-06	
		3	5.70E-03	6.16E-05	9.7		
60	30%	1	5.91E-03	7.20E-05	2.5	1.00 +/- 0.02	8.0
		2	6.09E-03	8.26E-05	2.9	6.97E-05 +/- 3.82E-06	
		3	6.08E-03	5.68E-05	6.1		
70	10%	1	6.04E-03	6.17E-05	2.4	1.00 +/- 0.02	6.0
		2	6.10E-03	5.65E-05	1.7	6.29E-05 +/- 2.46E-06	
		3	6.07E-03	7.09E-05	7.3		
70	21%	1	6.13E-03	1.22E-04	5.2	1.00 +/- 0.02	7.1
		2	6.00E-03	1.15E-04	3.2	1.12E-04 +/- 4.65E-06	
		3	6.01E-03	9.93E-05	6.9		
70	30%	1	5.72E-03	2.03E-04	2.4	1.00 +/- 0.03	13.3
		2	6.13E-03	2.70E-04	11.5	2.53E-04 +/- 1.40E-05	
		3	5.94E-03	2.94E-04	6.1		
80	10%	1	6.28E-03	9.51E-05	6.1	1.00 +/- 0.02	5.8
		2	6.22E-03	9.12E-05	5.4	9.44E-05 +/- 3.30E-06	
		3	6.50E-03	9.68E-05	5.4		
80	21%	1	6.11E-03	1.37E-04	8.2	1.00 +/- 0.03	7.6
		2	6.06E-03	1.32E-04	7.0	1.34E-04 +/- 8.57E-06	
		3	6.08E-03	3.00E-04	11.4		
80	30%	1	5.98E-03	2.94E-04	4.9	1.00 +/- 0.03	8.8
		2	6.08E-03	3.00E-04	11.4	2.97E-04 +/- 1.78E-05	
		3	6.16E-03	1.65E-04	18.3		
85	10%	1	6.37E-03	8.46E-05	8.9	1.00 +/- 0.03	14.5
		2	6.17E-03	1.14E-04	8.6	8.91E-05 +/- 5.66E-06	
		3	6.97E-03	7.72E-05	13.6		
85	21%	1	6.18E-03	1.42E-04	7.6	1.00 +/- 0.03	14.7
		2	6.02E-03	1.83E-04	9.7	1.62E-04 +/- 8.61E-06	
		3	6.16E-03	1.65E-04	18.3		
85	30%	1	5.82E-03	5.97E-04	6.5	1.00 +/- 0.03	12.9
		2	5.66E-03	4.36E-04	5.9	4.68E-04 +/- 2.67E-05	
		3	5.76E-03	4.10E-04	7.3		
90	21%	1	6.13E-03	1.23E-04	7.7	1.00 +/- 0.03	11.6
		2	5.87E-03	1.76E-04	9.0	1.44E-04 +/- 1.02E-05	
		3	5.88E-03	1.40E-04	7.6		
90	30%	1	6.33E-03	3.01E-04	13.4	1.00 +/- 0.03	14.0
		2	6.00E-03	3.27E-04	15.6	3.14E-04 +/- 1.86E-05	
		3	5.72E-03	3.07E-04	12.4		

^a PP O₂ : partial pressure in oxygen imposed during the experiment

^b RMSE : relative root mean square error between experimental and predicted values (Eq. 35).

For each experimental condition (6 temperatures and 3 partial pressures of oxygen) and each separate serial of data (3 repetitions for each set of parameters, except for 80 °C 21% and 30% with only 2 repetitions), initial ascorbic acid concentration ($[AA]_0$) and apparent kinetic rate constant (k_{app}), were identified by minimizing the difference between experimental data and model.

The models obtained confirm that a simple first order model fits well the experimental data, as *RMSE* are good comprised between 1.7% (70 °C, 10%, 2) and 20.9% (50 °C, 21%, 1) with a mean lower than 9%. These first models are characterized by $[AA]_0$ values comprised between 5.52 and 6.97 mM, coherent with the initial quantity of AA injected in the reactor (around 5.6 mM) and by k_{app} values increasing with the temperature (from 3×10^{-5} s at 50 °C to 6×10^{-4} s at 85 °C) and with the partial pressure of oxygen (for example at 85 °C from 8×10^{-5} s at 10% to 6×10^{-4} s at 30%). However, the first observation concerning the absence of link to the oxygen content for the kinetics at 50 and 60 °C is confirmed with the same k_{app} values obtained at each partial pressure. Previous authors did not observe this behavior. Pénicaud et al., (2012) already noticed differences at 20 °C between kinetics at 0.028 and at 0.289 mM dissolved oxygen with k_{app} values of 1.9×10^{-7} and 1.4×10^{-6} s⁻¹ respectively. Eison-Perchonok & Downes, (1982) also observed significant difference in their k_{app} according to the percentage of oxygen with values comprised between 1.7 s⁻¹ at 10% and 3.5 s⁻¹ at 21% for 50 °C and 2.0 s⁻¹ at 10% and 3.4 s⁻¹ at 15% for 55 °C.

Then the $[AA]_0$ were used to standardize the ascorbic acid concentrations on a unit free axis expressing the ratio between the ascorbic acid concentration ($[AA]$) and the identified value of $[AA]_0$ (**Figure 27**). This way, the 3 separate serials of data per set of parameters can be reassembled to be treated as one. Visually, the dispersion of the data per set of parameter seems to be good with no superposition of the standard deviations between the different oxygen set points.

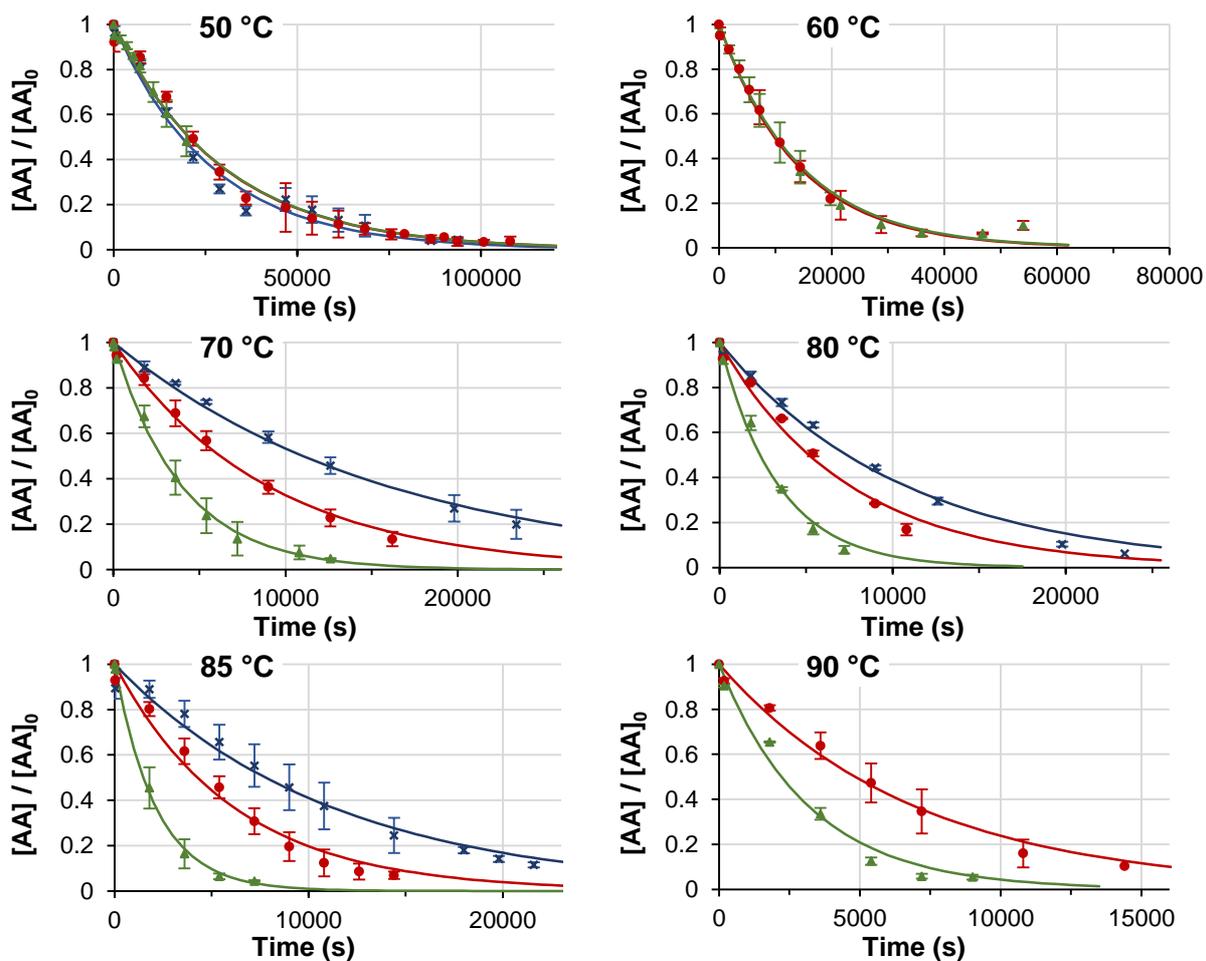


Figure 27. Kinetic models (—) (Eq. (36)) and experimental data (mean and standard deviation, $n = 3$) for 6 temperatures at 3 partial pressures of oxygen (\times , 10%; \bullet , 21%; \blacktriangle , 30%), of standardized ascorbic acid concentrations.

The values of k_{app} are, as expected, very close to the ones obtained with the separated data series (Table 1). However, the values found in this study are very low from the ones previously identified by other authors in comparable conditions. But literature itself presents contradictory results. For example, Blaug & Hajratwala, (1972) who worked in closed containers with headspace found values lower than Rojas & Gerschenson, (1997a) who worked in closed containers without headspace (k_{app} at 80 °C equals 0.11 s^{-1} and 1.4 s^{-1} respectively) for a same pH of 3.5, which is still very high compared to the values found here (k_{app} at 80 °C and 21% O_2 equals $1.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Eison-Perchonok & Downes, (1982) found

values even higher with k_{app} at 50 °C and 21% O₂ equals to 3.5 s⁻¹, but in this case the pH was higher at 6.1 and studies have shown that increasing the pH increases the value of the kinetic rate constant (Rojas & Gerschenson, 1997b; Van den Broeck et al., 1998; Wilson et al., 1995). Only the value of Pénicaud et al. (2012) seems to be in the same order of magnitude as the ones identified here, with a k_{app} value of 1.4 × 10⁻⁶ s⁻¹ at 20 °C and 21% of oxygen.

First order kinetic models (Eq. 36), adjusted on the standardized data enables to calculate global values of the apparent kinetic rate constant, confirming another time that the reaction seems to be dependent on the temperature and oxygen partial pressure (**Figure 28**).

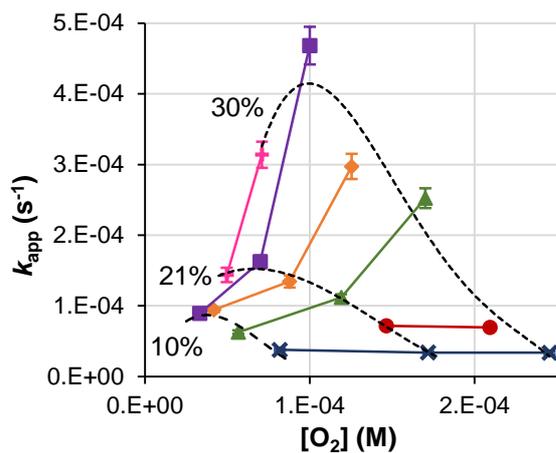


Figure 28. Kinetic rate constants (k_{app}) as a function of dissolved oxygen concentrations for 6 temperatures (×, 50 °C; ●, 60 °C; ▲, 70 °C; ◆, 80 °C; ■, 85 °C; +, 90 °C). Dotted lines (- -) schematize the behavior of k_{app} for iso-partial pressures of oxygen (10%, 21% and 30%).

However, it can be noted that at 90 °C, the value of k_{app} is lower than at 85 °C for a same oxygen partial pressure, which could appear contradictory to the generally admitted principle of Arrhenius's law. In fact, increasing the temperature also means decreasing the concentration of dissolved oxygen in the medium for an identical partial pressure, because of

the direct link between solubilized oxygen and temperature according to Henry's Law (Eq. 32).

3.2.2.1.3.3 Simple model including the oxygen dependence for ascorbic acid degradation

For an oxidative reaction such as ascorbic acid degradation, the oxygen concentration needs to be taken into account to calculate the real kinetic rate constant based on the stoichiometry of the reaction (Eq. 37).

$$\frac{[AA]}{[AA]_0} = \exp(-k_1 \cdot [O_2]^\beta \cdot t) \quad (37)$$

The determination of the real kinetic rate constant (k_1) has to be done conjointly with the stoichiometric coefficient (β), as none of both is clearly known. The identification of these parameters has been tried by testing different couples of k_1 and β values and calculating the *RMSE* obtained between the experimental data and the model each time (**Figure 29**). Results show that for a temperature there is not a single couple of $[k_1 ; \beta]$ values giving a low *RMSE*. In fact, the lowest level of *RMSE* can be obtained for extremely large domains of k_1 and β values. For example, an *RMSE* of 10-15% is obtained between $[k_1 = 7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1} ; \beta = 0]$ and $[k_1 = 3 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1} ; \beta = 0.7]$ at 60 °C and between $[k_1 = 4 \times 10^2 \text{ s}^{-1} ; \beta = 1.5]$ and $[k_1 = 5 \times 10^8 \text{ s}^{-1} ; \beta = 2.9]$ at 90 °C. The solver used is able to extract a single value for the couple of parameters (**Figure 29**) claiming that it is the best fit between model and experimental data, but knowing the behavior of *RMSE* as a function of k_1 and β , this "best fit" has to be taken really carefully.

In literature, 2 stoichiometries are encountered: $AA + 0.5O_2 \rightarrow DHAA + H_2O$ and $AA + O_2 \rightarrow DHAA + H_2O_2$ (Oey et al., 2006; Serpen & Gokmen, 2007; Wilson et al., 1995). It seems that the stoichiometric coefficient should be comprised between 0.5 and 1 if part of the ascorbic acid is degraded according to the first reaction and the other part according to the second reaction.

Regarding at **Figure 29**, β increases with the temperature, starting at 0 for 50 °C and finishing at 2.2 for 90 °C, 2 values outside the expected domain. From the results, it appears impossible to find a same β value enabling to fit acceptably all the temperatures, meaning that the preponderance between the two reaction pathways could be dependent on temperature. Despite that, some of the temperatures studied here could not be fitted by a β between 0.5 and 1, which is inconsistent with what was expected based on literature and probably means that there are other reaction pathways involved in ascorbic acid degradation.

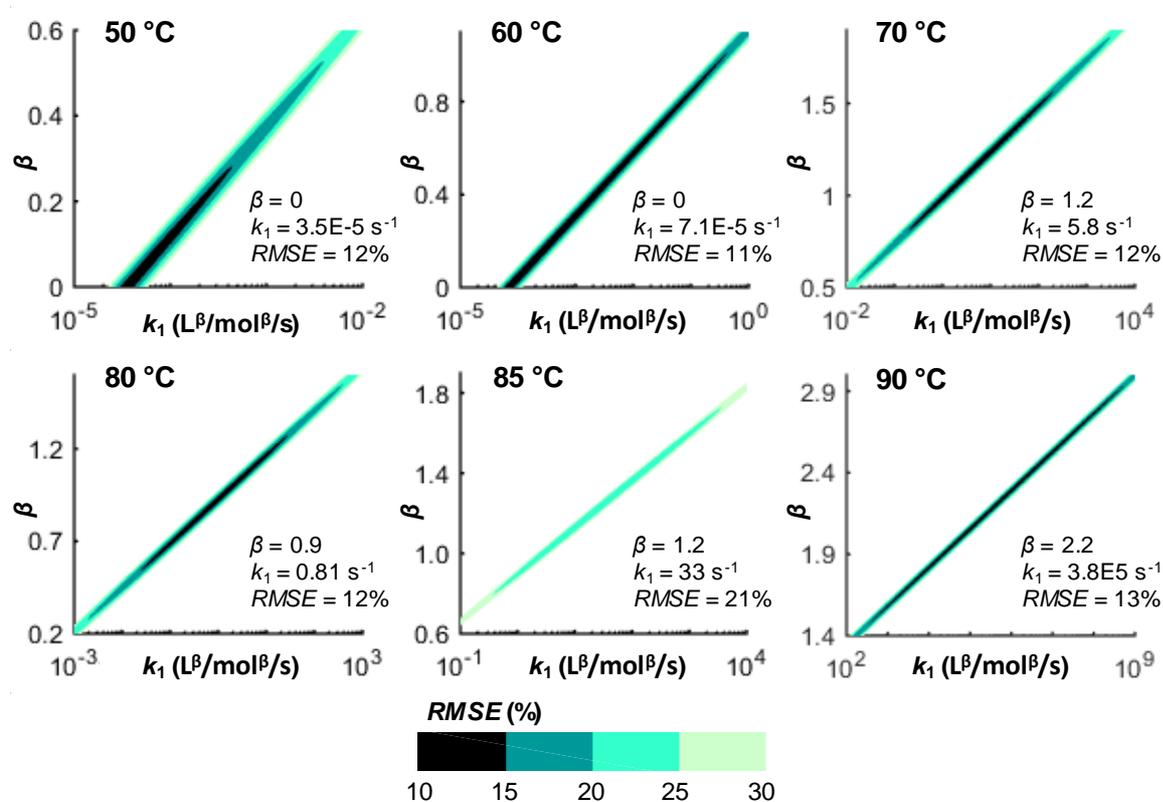


Figure 29. Evolution of the difference between experimental data and model described by equation 34. (*RMSE*) for different couples of kinetic rate constant (k_1) and β values at 6 temperatures. Values for β and k_1 mentioned on the graphs are the ones identified by the solver as giving the lowest *RMSE*.

3.2.2.1.4 Conclusion

This paper describes the effect of the temperature and dissolved oxygen concentrations on ascorbic acid behavior in liquid medium. The degradation of AA increases with the temperature and it is successfully described by a first order apparent kinetic model for all conditions of temperature and dissolved oxygen. But even if this model gives good simulation of the ascorbic acid behavior along time, it is not sufficient to explain well the oxygen dependence of the reaction. In fact, a strong dependence of the reaction on the dissolved oxygen content was found and it needs to be taken into account in the model. This way, the real kinetic rate constant (k_1) can be calculated and not only an apparent kinetic rate constant (k_{app}) depending on the oxygen concentration. Related to this k_1 , the stoichiometric coefficient of oxygen (β) needs to be also identified, which is difficult as both values are clearly linked. The identification of these two parameters gives large surface response instead of a single couple of values, showing the insufficiency of having only ascorbic acid concentration values to do the fitting. In order to refine the model more experimental values have to be acquired including dehydroascorbic acid (DHAA) concentrations and different initial conditions (starting from DHAA instead of AA, working without oxygen...). Finally, taking into account more reactions using a multiresponse type of modelling would probably help to better understand the vitamin C degradation.

3.2.2.1.5 Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under the grant agreement n° FP7-311754, Project Optifel.

The authors want also to thanks the CONACyT for funding of the doctoral fellowship of Braulio Gómez Ruiz.

3.2.2.2 Modélisation multi-réponse des concentrations en acides ascorbique et déshydroascorbique

Publication 3. Degradation kinetics of vitamin C at different temperatures and concentrations of dissolved oxygen in a model solution

2. Multiresponse modeling of ascorbic and dehydroascorbic acids concentrations

Stéphanie Roux*, Braulio Gómez Ruiz, Francis Courtois, Catherine Bonazzi

UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inra, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 69 93 50 99; fax: +33 (0)1 69 93 50 20.

Complete postal address: AgroParisTech, UMR1145 GENIAL, 1 avenue des Olympiades, F-91744 Massy cedex, France.

E-mail address: stephanie.roux@agroparistech.fr

Other authors e-mail addresses: braulio.gomezruiz@agroparistech.fr,
francis.courtois@agroparistech.fr, catherine.bonazzi@agroparistech.fr

Abbreviated title: Kinetic modeling of vitamin C degradation, a multiresponse model

Abstract

Vitamin C degradation is more complex than it could be expected. Two major ways of degradation are mentioned in literature. First, in presence of oxygen, ascorbic acid is degraded in dehydroascorbic acid further degraded to give back ascorbic acid or to form diketogulonic acid. Then, in absence of oxygen, ascorbic acid can be degraded to furfurals. Based on kinetic data acquired in a specific reactor for ascorbic and dehydroascorbic acids concentrations along time for 6 temperatures (50 - 90 °C) and 3 partial pressures of oxygen

(10 - 30%), a multiresponse model was built. After the kinetic parameters (reference kinetic rate constant and activation energy) and oxygen stoichiometric coefficient identifications, the model enables to simulate adequately the experimental data. However, the chemistry of the reaction is not fully explained as the oxygen stoichiometric coefficient remains dependent on temperature and the activation energy of the preponderant reaction is outside the classical range.

Key words: reaction kinetics, oxygen partial pressure, modeling

Highlights

- 4 reactions were identified as important to simulate vitamin C degradation
- The multiresponse model identified fit adequately experimental data
- The oxidative way is preponderant for ascorbic acid, hence vitamin C, degradation
- The stoichiometric coefficient of oxygen is dependent on temperature
- The chemistry of the reaction is not fully explained with only these 4 reactions

Chemical compounds studied in this article

Ascorbic acid (PubChem CID: 54670067); Dehydroascorbic acid (PubChem CID: 440667).

3.2.2.2.1 Introduction

Nutritional policies are nowadays to encourage fruit and vegetables consumption for their low caloric power and their richness in fibers and micronutrients such as vitamins, minerals or phenolic compounds (Amiot-Carlin et al., 2007; Barrett & Lloyd, 2012; Domínguez-Perles et al., 2013; Patil et al., 2009; Poiroux-Gonord et al., 2010; Rickman et al., 2007; Shashirekha et al., 2015). Among these nutrients, vitamin C is an essential one. The term vitamin C regroups two molecules exhibiting the same vitamin effect in the human

body: L-ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHAA) which are respectively the reduced and oxidized forms of a same molecule (Institute-of-Medicine, 2000).

Vitamin C is commonly used as a marker for process damages because of its high sensitivity to physico-chemical parameters such as light, pH, metals, oxygen and temperature (Oey et al., 2006; Serpen & Gokmen, 2007; Solomon & Svanberg, 1995; Wilson et al., 1995). In order to better understand the vitamin C reactivity, a lot of study have treated of apparent reactions at the food scale. But these works are only leading to empiric knowledge about the studied parameters effect (Devahastin & Niamnuy, 2010). On another side, some studies have focused on modeling the reaction at the molecular scale in order to better understand the reactional mechanisms (Penicaud et al., 2009).

Vitamin C and particularly ascorbic acid can be degraded by two main pathways: aerobic and anaerobic. The anaerobic pathway can be active in absence of oxygen but also in presence of oxygen in parallel with the aerobic pathway. It corresponds to complex mechanisms not fully elucidated. Kurata & Sakurai, (1967) have shown that at pH 2.2 in absence of oxygen, ascorbic acid is degraded into furfural, at the end of a very complex pathway involving a lot of intermediary compounds. Furfural formation after anaerobic heating of ascorbic acid has been shown by many authors (Louarme & Billaud, 2012; Robertson & Samaniego, 1986; Rodriguez et al., 1991; Vernin et al., 1998). The aerobic pathway can only be active in presence of oxygen and water. The first step consists in a reversible reaction between 1 mole of ascorbic acid and half a mole of dioxygen to form 1 mole of dehydroascorbic acid and 1 mole of water. Then the DHAA is irreversibly hydrolyzed into 2,3-diketogulonic acid (KGA) mole per mole (Serpen & Gokmen, 2007). Although many authors use this simplified pathway for vitamin C aerobic degradation, in fact, the reactions involved are much more complex as depending on equilibriums between the anionic forms of ascorbic acid, hence on the pH of the solution (Bradshaw et al., 2011). Another pathway for ascorbic acid oxidation has been shown by Wilson et al., (1995) in presence of a metallic catalyst. In this reaction, 1 mole of AA is oxidized by 1 mole of dioxygen to form 1 mole of DHAA and 1 mole of hydrogen peroxide. Then the DHAA would follow the same degradation

as previously, giving one mole of KGA. Finally the KGA is degraded via different pathways, not all known (Bradshaw et al., 2011; Yuan & Chen, 1998). (Yuan & Chen, 1998) have identified two final products issuing from KGA degradation, the 3-hydroxy-pyrone and the 2-furoic acid.

The study of the vitamin C degradation pathways is then complex because many ways can be involved at the same time and they differ according to the presence or absence of oxygen and metallic catalyst (Gregory, 1985). The intensity of the reactions are also very dependent on the pH as the oxidation rate is proportional to the ascorbate ion concentration (Danilewicz, 2003).

This work aims at better understanding the vitamin C degradation mechanisms by using a multiresponse modeling to simulate the ascorbic and dehydroascorbic acids kinetics and hence acquire kinetic rate constant and oxygen stoichiometric coefficient values for all the reaction pathways identified.

3.2.2.2.2 Material and Methods

3.2.2.2.2.1 Reagents

Crystalline ascorbic acid (AA) (99%), dehydroascorbic acid (DHAA) 99%, DL-dithiothreitol 99% and ethyl acetate 99.8% were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USE). Malic acid, metaphosphoric acid (40 - 50%), tris(hydroxymethyl)aminomethane and di-hydrated monobasic sodium phosphate were from VWR Prolabo chemicals (Luther Worth, England). Sodium hydroxide (97%), di-hydrated dibasic sodium phosphate and hydrochloric acid 37% were from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Water was from a Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) purifying water system.

3.2.2.2.2 Ascorbic and dehydroascorbic acids quantification

An indirect spectrophotometric measurement method was used to quantify both ascorbic and dehydroascorbic acids. This method was previously validated (Gomez-Ruiz et al., submitted) and used for kinetic purpose (Gomez-Ruiz, Roux, Courtois, & Bonazzi, submitted soon).

Briefly, 0.5 mL of sample containing both AA and DHAA are first diluted to 1/50 (v/v) in 3% (m/v) metaphosphoric acid (MPA) and read at 243 nm against a blank containing malate buffer (20 mM pH 3.8) instead of the sample and diluted in MPA in the same way. This absorbance (A) is then converted into an ascorbic acid concentration ($[AA]_{bc}$) thanks to a calibration curve (Eq. 38). This concentration will be further corrected to eliminate the bias caused by water evaporation during the kinetics.

$$A = 0.2135 \times [AA]_{bc} + 0.0292 \quad (38)$$

In parallel, in order to reduce DHAA in AA, 0.5 mL of sample is mixed with 0.5 mL of 30 mM DTT solution prepared in 0.1 mM phosphate buffer pH 7.5 and 1 mL of 0.2 M tris HCl buffer pH 8.2. After 30 min of reaction in an ice bath in the dark, the excess of DTT is eliminated by three successive extractions with ethyl acetate. The reduced sample is then recuperated and treated in the same way as the initial sample to acquire a second absorbance at 243 nm (A_{total}) and converted in another concentration in AA including both native AA and reduced DHAA ($[AA+DHAA]$). The initial concentration in AA is then deduced to obtain a concentration in DHAA before correction ($[DHAA]_{bc1}$). This concentration is further corrected using previously determined coefficients to give a DHAA concentration (Eq. 39) that will need to be corrected again for water evaporation during the kinetics ($[DHAA]_{bc}$).

$$[DHAA]_{bc} = \left([DHAA]_{bc1} \times \frac{1}{0.7524} \right) - (1.014 \times A_{total} + 0.1529) \quad (39)$$

The evaporation effect is corrected by recalculating the volume of the batch without evaporation and the corresponding concentrations (Eq. 40). Same equation is used for DHAA.

$$[AA]_t = \frac{[AA]_{bc} \cdot (V_0 - (V_e)_t - \sum_0^{t-1} V_s)}{(V_0 - \sum_0^{t-1} V_s)} \quad (40)$$

where $[AA]_t$ is the true concentration in ascorbic acid at time t , $[AA]_{bc}$ is the concentration before correction calculated directly from the calibration curve, V_0 is the initial volume of the reactor, $(V_e)_t$ is the evaporated volume at time t and $\sum_0^{t-1} V_s$ is the cumulated sampled volume till time $t-1$.

3.2.2.2.2.3 Equipment and kinetic assays

Kinetic assays were realized in a perfectly stirred reactor (EasyMax™ 102, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) with controlled temperature and partial pressure of oxygen provided by a gas mixer (GaxMix, AlyTech, Juvisy-sur-Orge, France). The complete equipment and its validation for kinetic purpose was detailed in Gomez-Ruiz et al., (submitted soon).

Experiments were all done in malate buffer (20 mM, pH 3.8). Before starting the kinetic, 95 mL of buffer are equilibrated to the chosen oxygen level by continuous bubbling and heated at the desired temperature for at least half an hour. To start, 5 mL of a 112 mM mother solution of AA or DHAA are added in the reactor.

Degradation kinetics were done starting with AA or with DHAA (about 5.6 mM initially). For both, AA and DHAA were analyzed all along the kinetic and until sufficient degradation of the initial product, when the duration was not too long. For the kinetics starting with AA, 6 temperatures (50, 60, 70, 80, 85 and 90 °C) and 3 percentages of oxygen (10, 21 and 30%) were repeated 3 times (only 2 for 85 °C, 21 and 30%). Two more kinetics were achieved without oxygen at 85 and 90 °C. For the kinetics starting with DHAA, 3 temperatures (50, 70 and 90 °C) were tested in absence of oxygen and repeated 2 times.

3.2.2.2.2.4 Dissolved oxygen concentration

The oxygen level was adjusted by monitoring the oxygen percentage (%O₂) of the bubbling gas delivered continuously in the reactor. This %O₂ can be converted into a partial pressure in oxygen (p_{O_2} in Pa) using the atmospheric pressure (P_{atm} in Pa) (Eq. 41).

$$p_{O_2} = \frac{\%O_2}{100} * P_{atm} \quad (41)$$

The oxygen concentration ($[O_2]$ in M) can then be calculated using (Eq. 42) using the oxygen molecular mass (M_{O_2} in g/mol) and in which the Henry's constant (H_{O_2} in g/L/Pa) has to be previously determined using Winkler's table for each temperature (Winkler, 1888).

$$[O_2] = \frac{p_{O_2} \cdot H_{O_2}}{M_{O_2}} \quad (42)$$

3.2.2.2.2.5 Modeling tools

Data were treated using Matlab® (Mathworks, Natick, Massachusetts, Etats-Unis). A solver ("ode15s") was used to solve the ordinary differential equations system and a minimization function ("fminsearch") to identify the unknown parameters with the sum of squares (SS) between experimental and modeled data as criterion (Eq. 43).

$$SS = \sum_1^n ((y_i - \hat{y}_i)^2) \quad (43)$$

where y_i are the experimental values and \hat{y}_i the predicted values.

To qualify the fitting of the model, the relative root mean square error (RMSE) was used (Eq. 44).

$$RMSE = \frac{1}{\bar{\hat{y}}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_1^n ((y_i - \hat{y}_i)^2)}{n}} \quad (44)$$

where $\bar{\hat{y}}$ is the mean of the predicted values and n the number of predicted values.

3.2.2.2.3 Results and Discussion

3.2.2.2.3.1 Definition of the reaction pathways

According to literature, two ways of degradation can be identified for ascorbic acid: aerobic and anaerobic (**Figure 30**).

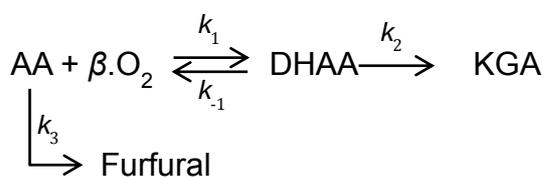


Figure 30. Selected reaction pathways for ascorbic acid degradation

The aerobic way involves oxygen with a stoichiometric coefficient β which seems to be not well known. Previous results detailed in Gomez-Ruiz et al., (submitted soon), have shown that β could have different values according to temperature. More, according to the same study, this coefficient β is linked to the first reaction rate constant k_1 leading to the formation of dehydroascorbic acid (DHAA). This DHAA can then be degraded by a second reaction to form diketogulonic acid (KGA) with a kinetic rate constant k_2 , or by the reverse of the reaction 1 to form again ascorbic acid (AA) and oxygen (O_2) with a kinetic rate constant k_{-1} . The anaerobic degradation way for AA does not involve oxygen and leads to the formation of furfural with a global kinetic rate constant k_3 .

In this reaction scheme, the DHAA is a central compound for the oxidative way of degradation, being an intermediary molecule, produced and degraded at the same time. This behavior has been confirmed by the kinetics of DHAA content (**Figure 31**) which were acquired conjointly with the AA kinetics previously shown in detail in Gomez-Ruiz et al., (submitted soon). In fact, the DHAA kinetics show a first phase during which its concentration increases along time, followed by a second phase during which its concentration decreases, a behavior typical of this kind of intermediary compounds. **Figure 31** also highlight the same oxygen dependence that was already noted for AA that is: no difference for the 10, 21 and 30% partial pressure of oxygen at 50 and 60 °C and a more visible difference for the other temperatures (70 - 90 °C). It also has to be noted that concentrations of DHAA are low compared to the ones of AA, most of the time near or under the limit of quantification of the analytical method (Gomez-Ruiz et al., submitted) and that the maximum amount detected decreases with temperature.

The occurrence of the anaerobic degradation way at quite low temperature (such as the 50 - 90 °C domain studied here) is not really documented. Two kinetics, 85 °C and 90 °C - 0% of dissolved oxygen, were then realized in order to confirm that a part of the AA

degradation is really due to this reaction pathway. They both showed a small decrease in the AA concentration along time with no DHAA formed (**Figure 32**), meaning that this degradation pathway is not negligible in the domain of temperature studied here.

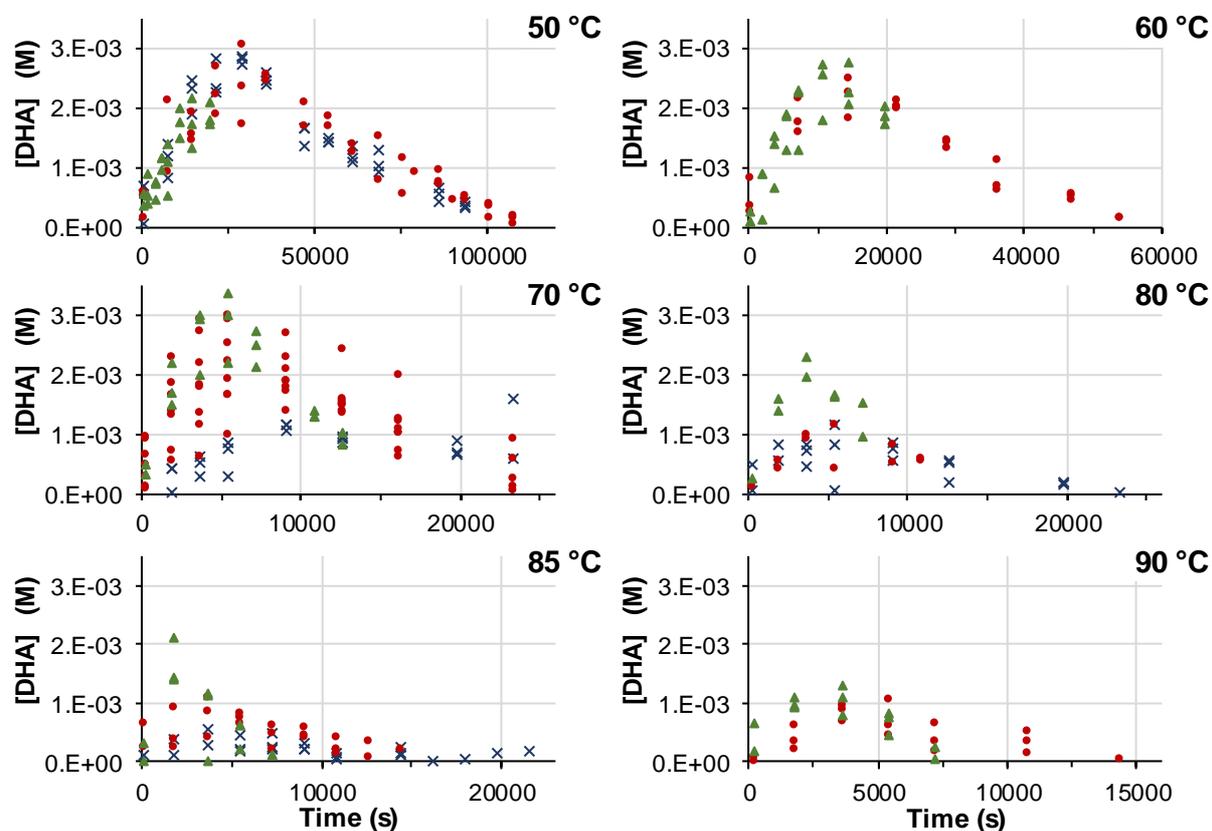


Figure 31. Kinetics of dehydroascorbic acid formation and degradation in a solution initially containing about 5.6 mM of ascorbic acid for 6 temperature and 3 partial pressures of oxygen: \times , 10%; \bullet , 21%; \blacktriangle , 30% ($n = 3$).

On the same way, the reverse of the reaction 1 forming AA and O_2 from DHAA is also not always taken into account. Some experiments in absence of oxygen and starting from DHAA were done in order to confirm the occurrence of this reaction pathway (**Figure 33**). These experiments clearly show a degradation of the DHAA which was expected through the reaction 2, but also a slight increase in the AA content which can only be due to the reverse

of the reaction 1. It confirmed that this pathway is also active in the studied range of temperature.

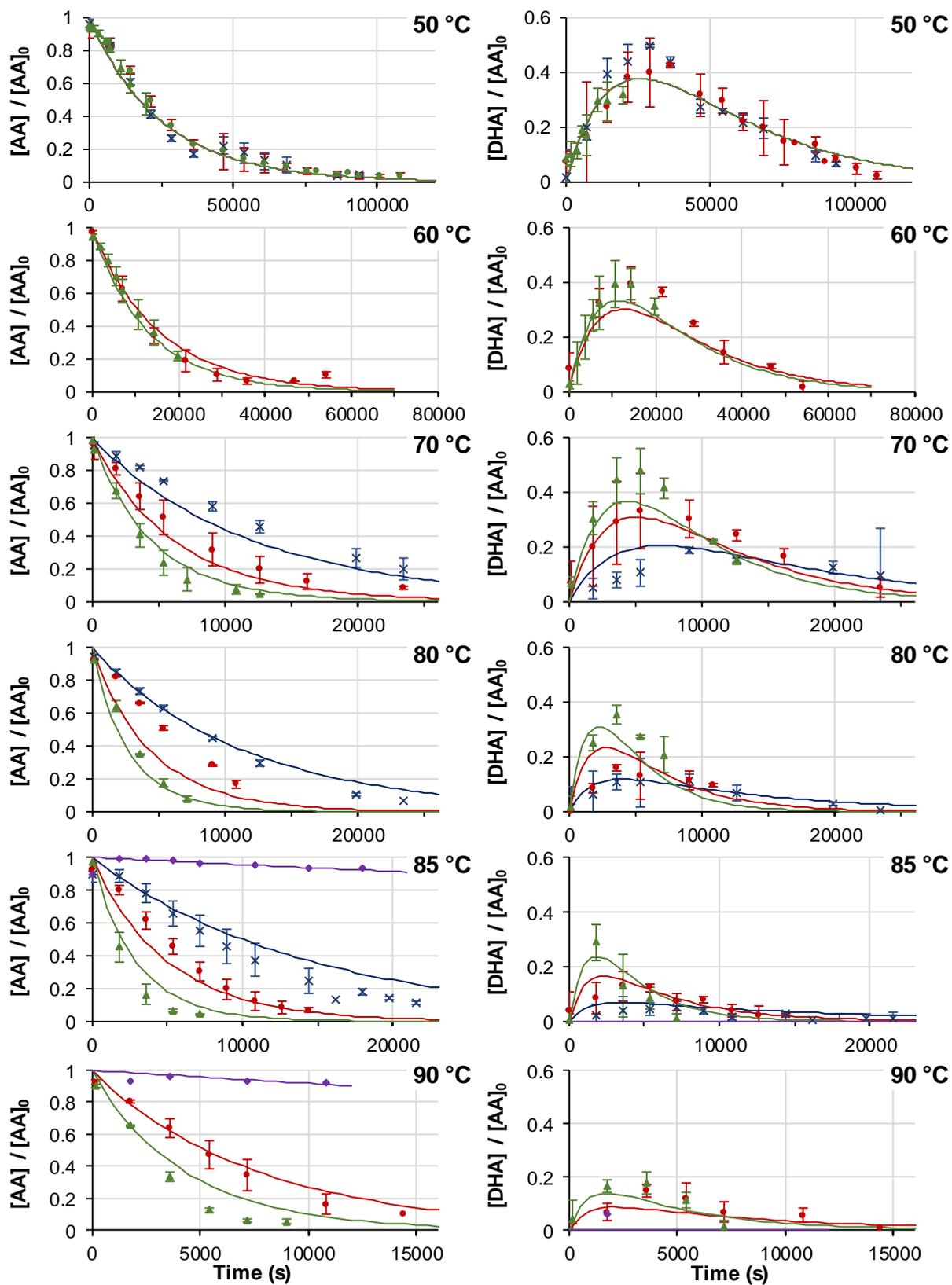


Figure 32. Modeling of standardized ascorbic and dehydroascorbic acids behavior in solutions initially containing about 5.6 mM of ascorbic acid: kinetic models according to Eqs. (46) and (47) (—), and experimental data (mean and standard deviation, $n=3$) for 6 temperatures at 4 partial pressures of oxygen (\blacklozenge , 0%; \times , 10%; \bullet , 21%; \blacktriangle , 30%).

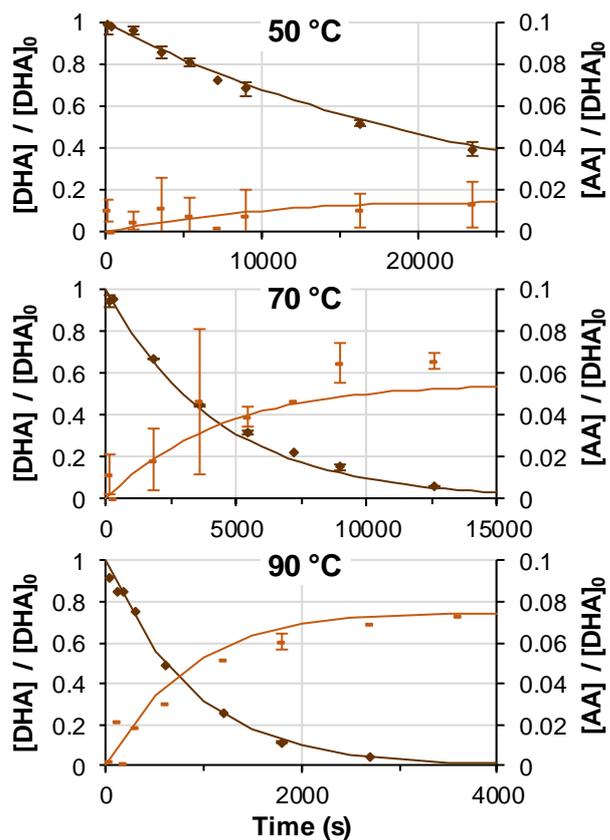


Figure 33. Modeling of standardized dehydroascorbic (◆) and ascorbic (–) acids behavior in solutions initially containing about 5.6 mM of dehydroascorbic acid: kinetic models according to Eqs. 46 and 47, and experimental data (mean and standard deviation, $n = 2$) for 3 temperatures at 0% of oxygen.

3.2.2.2.3.2 Kinetic parameters determination

Based on the 4 reactions mentioned on **Figure 30**, several kinetic and stoichiometric parameters had to be identified. First, in order to take into account the impact of temperature, Arrhenius law was used. To increase the accuracy of the parameter identification, it was chosen to use the reparametrized Arrhenius law (Eq. 45) which enables to center the domain of application of the parameters in the range of the temperature values studied rather than determining a pre-exponential factor corresponding to a temperature very far away from the studied domain (Van Boekel, 2009). For each of the 4 reactions, k_{ref} and E_a have to be identified.

$$k_{n(T)} = k_{n_{ref}} \cdot \exp\left(-\frac{E_{a_n}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad (45)$$

where $k_{n(T)}$ is the n^{th} reaction kinetic rate constant at temperature T , $k_{n_{ref}}$ the n^{th} reaction rate constant at the reference temperature T_{ref} (here 70 °C as the center of the experimental temperature range of the study), E_{a_n} the activation energy of the n^{th} reaction and R the perfect gas constant.

Second, the stoichiometric coefficient for oxygen β has also to be identified and according to previous results (Gomez-Ruiz et al., submitted soon), it was chosen to determine a different value of this parameter for each temperature studied.

The system was then transformed into the following equations:

$$\frac{dAA}{dt} = -k_1 \cdot O_2^\beta \cdot AA - k_3 \cdot AA + k_{-1} \cdot DHAA \quad (46)$$

$$\frac{dDHAA}{dt} = k_1 \cdot O_2^\beta \cdot AA - k_2 \cdot DHAA - k_{-1} \cdot DHAA \quad (47)$$

The identification of all parameters at the same time seems to be quite complicated due to the number of unknown (4 couples k_{ref} / E_a and 6 β) even if the quantity of data available is very big (starting from AA: 2 markers, between 5 and 17 kinetic points for 6 temperatures with 3 levels of oxygen and 3 repetitions for each; starting from DHAA : 2 markers, 8 kinetic point at 3 temperatures with 1 level of oxygen and 2 repetitions for each).

As the reaction 3 can be completely isolated from the others when working in absence of oxygen and starting with AA, it was decided to determine separately $k_{3_{ref}}$ and E_{a_3} with the two kinetics realized at 85 and 90 °C, being aware that with only two kinetics these values are not very precise. But as the extent of the reaction 3 seems to be very limited at the highest temperatures, having an approached value for lower temperature can be considered as with very little consequences on the global model adjustment.

The model was then built in Matlab® and the software was used to solve the differential equations and to identify the other unknown parameters thanks to a minimization function of the sum of squares between the experimental and the predicted value. To do so, standardized values of AA and DHAA concentrations were used (meaning that all values of

both AA and DHAA were divided by the initial concentration of AA, for the kinetics starting with AA, or of DHAA for the kinetics starting with DHAA). Results obtained are presented in **Tableau 14**.

Tableau 14. Parameters value and adjustment of the complete multiresponse model of AA and DHAA kinetics

<i>Kinetic parameters</i>		Reaction number (according to Figure 29)					
		1	-1	2	3		
$k_{ref}(70\text{ °C})$	(s ⁻¹) ^a	5.6E-01	1.3E-05	2.2E-04	5.7E-07		
E_a	(J/mol)	4.4E+05	1.0E+05	8.2E+04	1.4E+05		
<i>Stoichiometric coefficient of oxygen</i>							
Temperature (°C)		50	60	70	80	85	90
β		0	0.5	0.9	1.3	1.5	1.7
Linear fitting of $\beta = f(T)$ ^b :		$\beta = 0.042 \cdot T - 13.5$;				$R^2 = 0.998$	
<i>Model adjustment</i>							
$RMSE$	(%)	AA	DHAA				
		17.3	35.8				

^a except for k_{1ref} (L ^{β} /mol ^{β} /s)

^b T in K

Concerning the kinetic parameters, it can be noted that the preponderant reaction is the reaction 1 with a reference kinetic rate constant a lot higher than the others. However, the activation energy of this reaction is very high compared to what is usually found (between 50 and 150 kJ/mol). It might alert about the trueness of this value. Then, at the reference temperature, the reaction 2 is almost 17 times faster than the reverse of the reaction 1 ($k_{2ref} = 2.2E-04\text{ s}^{-1}$ and $k_{-1ref} = 1.3E-05\text{ s}^{-1}$) and as expected, the reaction 3 is the slowest ($k_{3ref} = 5.7E-07\text{ s}^{-1}$). Concerning the activation energies for these 3 reactions, the values found are between the classical limits. The stoichiometric coefficient of oxygen β confirms its previously shown behavior (Gomez-Ruiz et al., submitted soon) by exhibiting a strong dependency to the temperature with a linear fitting of β as a function of T presenting a coefficient of determination R^2 equals to 0.998 all over the 6 values of temperature. As expected from the observation of the kinetics, β is low at low temperature (0 at 50 °C) and its

value goes a lot higher than 1 (1.7 at 90 °C). Another time the previous results are confirmed as only two temperatures exhibit values of β comprised between 0.5 and 1, that should have been the theoretic interval of all the β values. Same range values for β were found by Pénicaud, (2009), i.e. 0.6 to 1.6 depending on the temperature but for a temperature range of 8 to 33 °C which is inconsistent with the β behavior identified here because in this study, β is equal to zero at 50 °C. It has to be noted that Pénicaud values are also out of the theoretical domain for β values.

3.2.2.2.3.3 *Adjustment of the model and parameters sensitivity*

The adjustment of the complete model is quite good when compared to the experimental data. Fig. 3 shows that the model enable to fit well the kinetics starting with AA. The combination of the different parameters identified (reference kinetic rate constants and activation energy) seems to be adequate as the tendency of the modelled curves is clearly the same as the experimental ones. The oxygen dependency is quite well respected for both AA and DHAA notwithstanding a lower fitting for high temperatures. The higher the temperature, the higher the gap between the model and some kinetics. For example, at 80 °C the kinetics for 10 and 30% of oxygen partial pressure are well described but not the one for 21% highlighting a probable lack in the model concerning the oxygen dependency. On the **Figure 33**, the same conclusion can be drawn concerning the adequacy of the identified kinetic parameters as the AA and DHAA experimental kinetics are particularly well described by the model. Globally, the model adjustment can be qualified of good by looking at the global root mean square error (*RMSE*) between experimental and modelled values. A *RMSE* of 17.3% is obtained for all models of AA concentrations and of 35.8% for DHAA (**Tableau 14**). As experimental values of DHAA are low and sometimes really near or under the quantification limit of the analytical method, it is not surprising that the adequacy of model is lower than for AA.

The sum of squares sensitivity to a 10% variation of the kinetic parameters was tested (Fig. 5). Results show that for both an increase and a decrease of 10%, the activation energy of the reaction 1 is the most sensitive parameter. Its modification provokes an increase in the sum of squares comprised between 2 and 20 times depending on the serial and between 2 and 3 times on all serials cumulated. The modification of the reference kinetic rate constant for this reaction 1 has also significant consequences by modifying the sum of square by a multiplicative coefficient comprised between 0.6 and 1.5 but with no visible impact on all serials.

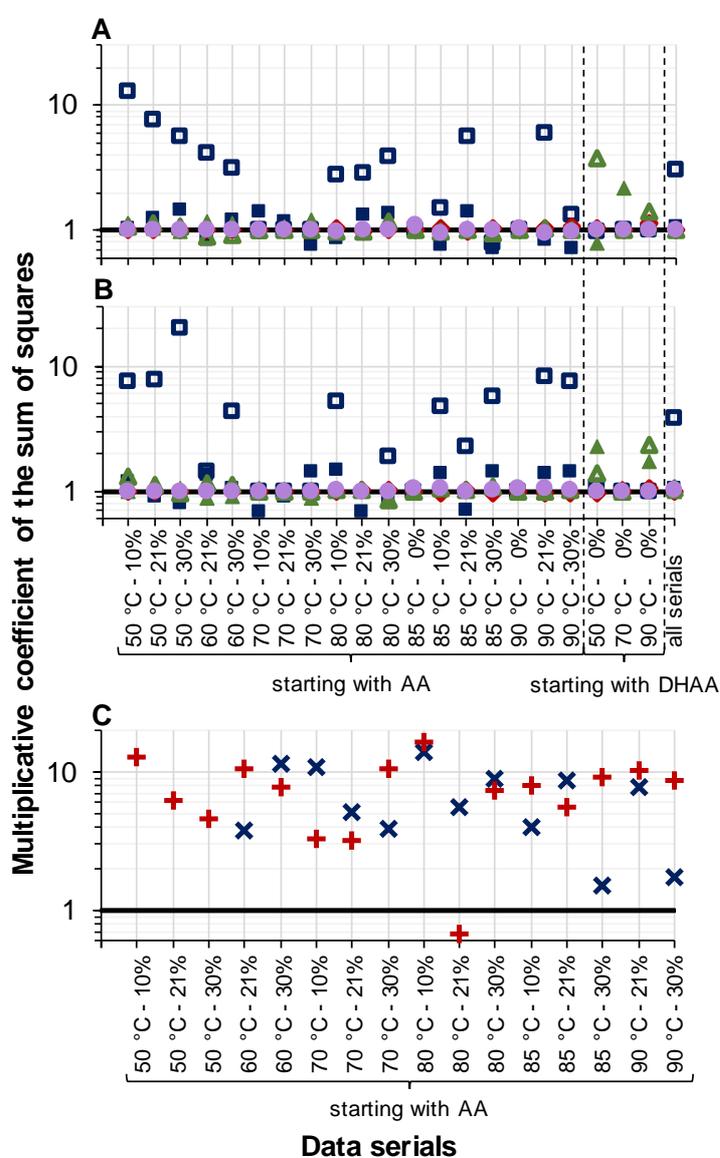


Figure 34. Change in the sum of the squares between modelled and experimental data induced by a variation of one kinetic parameter (\blacksquare , k_{1ref} ; \square , E_{a1} ; \blacklozenge , k_{-1ref} ; \blacklozenge , E_{a-1} ; \blacktriangle , k_{2ref} ;

\triangle , E_{a_2} ; \bullet , $k_{3_{ref}}$; \circ , E_{a_3} ; \times , $\beta-0.1$; $+$, $\beta+0.1$) relatively to the reference (—). A: 10% increase of the parameter reference value; B: 10% decrease of the parameter reference value; C: variation of β .

The modification of the other parameters related to the reactions -1, 2 and 3 does not exhibit any increase or decrease on the sum of squares, except for the reaction 2 parameters which have an impact on the serials starting with DHAA. It is not a surprise because for these serials reaction 2 is the most important, as reaction 1 is not occurring because of the absence of oxygen. Same methodology applied to the stoichiometric coefficient β by increasing or decreasing it of 0.1 shows that the sum of square is very sensitive to this parameter. Its value increases by 3 to 17 times for most serials. The fact that reaction 1 parameters and β are the most influents on the adequacy of the model highlight the difficulty in separating these variables during the identification. As noticed regarding the value of reaction 1 activation energy which is a lot higher than usually, the reaction 1 as written here, might hide more reactions probably involving free radicals (Bradshaw et al., 2011).

3.2.2.2.4 Conclusion

The 4 reactions identified in this study lead to the construction of a multiresponse model predicting adequately the concentrations of ascorbic and dehydroascorbic acids along time for a temperature range of 50 to 90 °C and an oxygen content of 0 to 30%, and with the same simulation quality regarding values obtained from kinetics starting with AA or with DHAA. A further step would be to validate the model on new serials of data, maybe acquired with dynamic conditions of temperature, as the temperature dependence of the model is fully explained by Arrhenius law and the linear behavior of the oxygen stoichiometric coefficient along temperature. However, concerning the chemical understanding of the reaction pathways, the degradation of the vitamin C appears more complex than expected. The data collected for this study clearly show the oxygen dependence of the reaction. Among the 4 reactions identified here, ascorbic acid oxidative degradation is the most important but remains the less understood. It involves a stoichiometric coefficient for oxygen which

appears proportional to temperature and with values outside the expected domain: too low at temperatures lower than 60 °C, too high at temperatures higher than 70 °C. More, the model is particularly sensitive to a variation of this coefficient value which shows the importance in better understanding what is hidden behind this atypical behavior. Another anomaly is probably linked as the activation energy of this first reaction is a lot higher than what is usually found for such reactions and also impacts strongly the model answer. Further experiments should focus on this reaction step trying to understand if some explanation could come from free radicals reactions or from a modification of the ascorbic acid dissociation constant due to temperature which could change the reactivity of the molecule.

3.2.2.2.5 Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under the grant agreement n° FP7-311754, Project Optifel. The authors want also to thanks the CONACyT for funding of the doctoral fellowship of Braulio Gómez Ruiz.

Synthèse

4. Synthèse

Au cours de cette thèse, l'objectif général a été atteint, avec la construction d'un modèle réactionnel complexe capable de nous aider à comprendre le comportement de la vitamine C (AA et DHAA) pendant un traitement thermique.

Ceci a été accompli en réalisant les objectifs suivants :

1. Le développement d'une méthode de quantification pour mesurer l'acide ascorbique (AA) et l'acide déshydroascorbique (DHAA) et sa validation
2. L'obtention de données cinétiques de concentrations en AA et DHAA à différentes températures et concentrations en oxygène dissous.
3. La construction de modèles de simulation plus ou moins complexes et la détermination des paramètres réactionnels associés

Le premier point est développé plus en détail dans le 1^{er} article. Une méthode spectrophotométrique a été mise en place pour quantifier l'AA et le DHAA de manière directe, en milieu liquide.

Un facteur de correction a été appliqué pour la détermination de la concentration en DHAA, certainement à cause de la complexité de la méthode qui utilise de nombreux réactifs. La vérification de manière séparée de ces réactifs a montré que certaines solutions peuvent provoquer une légère augmentation de l'absorbance mesurée, ce qui pourrait aider à expliquer l'utilisation d'un facteur de correction.

La méthode a été validée sur les deux composés avec une linéarité acceptable de la gamme d'étalonnage utilisée (0 - 6,95 mM) et avec des limites de détection et de quantification de 0,236 mM et 0,467 mM, respectivement. La fidélité et la justesse sont aussi acceptables avec un coefficient de variation de la répétabilité et reproductibilité inférieur à

6% pour l'AA et inférieur à 15% pour le DHAA et un recouvrement de 95 - 99% pour l'AA et de 88 - 132% pour le DHAA.

Cette première partie montre que la méthode par spectrophotométrie est simple, fiable, et rapide pour la quantification de la concentration en AA (environ 5 min) et en DHAA (environ 35 min, en prenant en compte 30 min de stockage pour la réduction du DHAA en AA).

De ce fait la méthode spectrophotométrique a été utilisée pour l'obtention de cinétiques de dégradation de l'AA et du DHAA à différentes températures (50, 60, 70, 80, 85 et 90 °C) et à différentes concentrations en oxygène dissous en pression partielle (0, 10, 21 et 30%), permettant de constituer une base de données puisqu'il y a un défaut d'informations dans la bibliographie. Cette base de données a été utilisée pour la construction d'un modèle réactionnel capable de déterminer les paramètres intervenant dans la réaction et de s'ajuster aux données expérimentales pour aider à comprendre les réactions impliquées au cours de la dégradation de la vitamine C dans la gamme de température utilisée.

Deux modèles réactionnels ont été étudiés : un modèle simple qui comprend la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique en déshydroascorbique, et un modèle complexe avec deux voies de dégradation identifiées : oxydative et thermique.

L'ajustement des deux modèles aux valeurs expérimentales a été réalisé dans tous les cas en cherchant à minimiser la somme des carrés des écarts.

Le modèle simple de premier ordre s'est bien ajusté aux données expérimentales obtenues, permettant l'obtention d'une constante de vitesse apparente (k_{app}), qui présente une dépendance à la température et à la concentration en l'oxygène.

Cette constante k_{app} a montré un comportement contradictoire à la loi d'Arrhenius, en diminuant entre 85 °C et 90 °C. La solubilité de l'oxygène joue un rôle important sur les résultats, du fait que lorsque la température augmente, cela provoque une diminution dans la

concentration en oxygène dissous dans le milieu pour une pression partielle en oxygène identique. Donc pour la partie oxydative de la réaction de dégradation de l'AA, la concentration en oxygène a été prise en compte pour calculer une constante de vitesse réelle (k_1) pour une réaction tenant compte de la stœchiométrie de l'oxygène (β).

Une détermination conjointe des constantes de vitesse de dégradation réelle (k_1) et des coefficients stœchiométriques (β) pour chaque température a été réalisée. Le balayage d'un grand domaine de valeur pour chacun des paramètres a montré que l'ajustement entre le modèle et les données expérimentales était aussi bon pour de nombreux couples de valeurs, mettant en évidence une corrélation forte entre les valeurs des deux paramètres. Il a également été montré que β été positivement corrélé à la température. Malgré la dispersion des valeurs de β obtenues, il a été impossible de sélectionner une valeur unique pour toutes les températures utilisées. De plus, les valeurs trouvées sortaient parfois largement de la gamme dans lesquelles elles auraient dû se trouver selon la littérature (0,5 - 1). Ce comportement de β n'est pas explicable et montre que le modèle simple de premier ordre utilisé n'est pas suffisant pour décrire la réaction de dégradation de l'acide ascorbique. La présence d'autres voies de dégradation prises en compte dans un modèle plus complexe pourraient être en mesure d'aider à mieux décrire le phénomène de dégradation de la vitamine C.

La construction du modèle plus complexe a été réalisée, prenant en compte deux voies de dégradation : oxydative et non oxydative. La voie oxydative comporte 3 réactions et donc autant de constantes de vitesse (k) : la dégradation de l'AA en DHAA (k_1) qui est réversible (k_{-1}) et la dégradation du DHAA en acide dicétogulonique (*diketogulonic acid*, KGA) (k_2). La voie de dégradation non-oxydative conduit elle à la formation de furfural (k_3). Les paramètres réactionnels (k_{ref} , et E_a) ont été déterminés pour chaque réaction selon une équation reparamétrisée de la loi d'Arrhenius permettant de prendre en compte l'impact de la température.

Le coefficient stœchiométrique de l'oxygène β présent dans la voie réactionnelle oxydative a été identifié pour chaque température. Une relation linéaire très bien corrélée avec la température a été montrée. Cependant, les valeurs obtenues sont pour la plupart en dehors du domaine de stœchiométrie décrit dans la littérature et la raison de ce comportement n'est pour l'instant pas expliquée.

La combinaison des paramètres réactionnels déterminés (k_{ref} , E_a et β) a montré une tendance appropriée entre les courbes prédites par le modèle et celles des données expérimentales.

Une variation de $\pm 10\%$ sur la valeur de chaque paramètre déterminé a été réalisée pour identifier lequel a le plus de sensibilité en fonction de la variation de réponse de la somme des carrés des écarts entre les données obtenues par le modèle et les données expérimentales, montrant que le coefficient de stœchiométrie β , la constante de vitesse de la dégradation de l'AA en DHAA (k_1) et l'énergie d'activation (E_{a1}) sont les paramètres les plus sensibles à une variation.

Conclusion et perspectives

5. Conclusion et perspectives

En conclusion notre modèle complexe est capable de prédire ce qu'il se passe quand on démarre avec l'AA ou avec le DHAA dans la gamme d'étude utilisée. Cependant si on veut enrichir la base de données, il faudra faire des cinétiques de dégradation à plusieurs pH pour mieux comprendre le phénomène, car la dissociation du L-ascorbate n'a pas été prise en compte, du fait que les travaux ont toujours été réalisés à un pH de 3,8. De plus si l'on souhaite valider le modèle complexe, il faudra d'autres acquisitions de cinétiques en faisant varier la température et la concentration en oxygène.

Pour avoir plus d'information et aider à la construction d'un modèle encore plus complet qui prend en compte les paramètres réactionnels et du transport de matière, la suite de l'étude de la dégradation de la vitamine C devra être faite en milieu solide. Cela pourrait être utilisé pour arriver à comprendre la vitamine C se dégrade dans un produit alimentaire pendant un séchage. Les étapes pourraient être envisagées de la manière suivante :

- D'abord, Il sera important faire des études dans un milieu solide modèle (gel), commençant par l'identification du type de gel qui soit capable de supporter les conditions de température à utiliser. Ensuite la vérification du comportement de l'AA dans un gel par le modèle complexe obtenu en faisant de cinétiques de dégradation de la vitamine C dans le gel avec certaines conditions de température et oxygène dissous, en espérant que le comportement soit le même que celui obtenu en milieu liquide. Si c'est le cas, la détermination des propriétés de transport de diffusion pour l'AA en absence d'oxygène sera réalisée, par contre si ce n'est pas le cas, l'obtention d'une nouvelle base de données sera nécessaire à partir de données cinétiques obtenues sur un gel.
- Ensuite la réalisation de cinétiques de séchage en faisant varier la température et l'activité de l'eau du gel permettra de regarder l'effet du transport de l'eau.

- Finalement, les paramètres de diffusion pourront être couplés avec le modèle réactionnel pour la construction du modèle complet finalement validé pour le séchage des produits alimentaires.

Références bibliographiques

6. Références bibliographiques

- Amiot-Carlin, M. J., Caillavet, F., Causse, M., Combris, P., Dallongeville, J., Padilla, M., Renard, C. & Soler, L. G. (2007). *Les fruits et légumes dans l'alimentation enjeux et déterminant de la consommation*.
- AOAC. (1980). Official methods of analysis of the AOAC. In W. Horwitz (Ed.), *Journal of pharmaceutical sciences* (13th ed., Vol. 70). Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Arya, S. P., Mahajan, M., & Jain, P. (2000). Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C. *Analytica Chimica Acta*, 417(1), 1–14.
- Arya, S. P., Mahajan, M., & Jain, P. (2001). Spectrophotometric determination of vitamin C with iron(II)-4-(2-pyridylazo)resorcinol complex. *Analytica Chimica Acta*, 427(2), 245–251.
- Ball, G. F. M. (2006). *Vitamins in foods: Analysis, bioavailability and stability*. Boca Raton, FL, USA.: CRC Press Taylor & Francis.
- Barrett, D. M., & Lloyd, B. (2012). Advanced preservation methods and nutrient retention in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(1), 7–22.
- Blaug, S. M., & Hajratwala, B. (1972). Kinetics of aerobic oxidation of ascorbic acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(4), 556–562.
- Block, G. (1991). Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*, (53), 270S–282S.
- Bosch, V., Cilla, A., García-Llatas, G., Gilabert, V., Boix, R., & Alegría, A. (2013). Kinetics of ascorbic acid degradation in fruit-based infant foods during storage. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 298–303.
- Bradshaw, M. P., Barril, C., Clark, A. C., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2011). Ascorbic acid: A review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 479–498.
- Burdurlu, H. S., Koca, N., & Karadeniz, F. (2006). Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *Journal of Food Engineering*, 74(2), 211–216.
- Chebrolu, K. K., Jayaprakasha, G. K., Yoo, K. S., Jifon, J. L., & Patil, B. S. (2012). An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 443–449.
- Chiari, M., Nesi, M., Carrea, G., & Righetti, P. G. (1993). Determination of total vitamin C in fruits by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography.*, 645, 197–200.
- Coker, G., Davey, K., & Kristal, Z. (1993). Modelling the combined effect of pH and temperature on the denaturation of vitamin in a tubular steriliser. In *Process industries power the pacific rim: sixth conference of Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering* (pp. 107–112).

- Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 73–85.
- Davey, M.W., Van Mortagu, M., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D. & Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 825–860.
- de Levie, R. (2012). *Advanced excel for scientific analysis* (3rd ed.). Atlantic Academic L.L.C.
- Delchier, N., Reich, M., & Renard, C. M. G. C. (2012). Impact of cooking methods on folates, ascorbic acid and lutein in green beans (*Phaseolus vulgaris*) and spinach (*Spinacea oleracea*). *Food Science and Technology*, 49, 197–201.
- Demiray, E., Tulek, Y., & Yilmaz, Y. (2013). Degradation kinetics of lycopene, β -carotene and ascorbic acid in tomatoes during hot air drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 172–176.
- Deutsch, J. C. (2000). Dehydroascorbic acid (Review). *Journal of Chromatography. A*, 881(1-2), 299–307.
- Devahastin, S., & Niamnuy, C. (2010). Modelling quality changes of fruits and vegetables during drying: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(9), 1755–1767.
- Devic, E. (2010). *Impact des procédés de déshydratation sur les transferts de matière et sur le mécanismes de dégradation de l'acide ascorbique et des composés phénoliques de la pomme: Application à six variétés de pommes de table ou à cidre*. Thèse de doctorat, AgroParisTech, Paris, France.
- Devic, E., Guyot, S., Daudin, J. D., & Bonazzi, C. (2010). Effect of temperature and cultivar on polyphenol retention and mass transfer during osmotic dehydration of apples. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 58, 606–614.
- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., & Amiot, M. J. (2007). Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4209–4216.
- Djendoubi Mrad, N., Boudhrioua, N., Kechaou, N., Courtois, F., & Bonazzi, C. (2012). Influence of air drying temperature on kinetics, physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 433–441.
- Domínguez-Perles, R., Mena, P., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2013). Brassica foods as a dietary source of vitamin C: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(8), 1076–1091.
- Eison-Perchonok, M. H., & Downes, T. W. (1982). Kinetics of ascorbic acid autoxidation as a function of dissolved oxygen concentration and temperature. *Food Science*, 47, 765–767.

- Eitenmiller, R. R., Ye, L., & Landen, J. O. W. (2008). *Vitamin analysis for the health and food sciences* (2nd editio). CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- Esteve, M. J., Farré, R., Frigola, A., & Garcia-Cantabella, J. M. (1997). Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 688(2), 345–9.
- Feinberg, M., & Laurentie, M. (2010). *Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Cahier Techniques de l'INRA* (Vol. No Special). Paris, France: INRA editions.
- Frei, B., Birlouez-Aragon, I., & Lykkesfeldt, J. (2012). Authors' perspective: What is the optimum intake of vitamin C in humans? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(9), 815–829.
- Gabriel, A. A., Usero, J. M. C. L., Rodriguez, K. J., Diaz, A. R., & Tiangson-Bayaga, C. L. P. (2015). Estimation of ascorbic acid reduction in heated simulated fruit juice systems using predictive model equations. *Food Science and Technology*, 64(2), 1163–1170.
- Garcia-Torres, R., Ponagandla, N. R., Rouseff, R. L., Goodrich-Schneider, R., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2009). Effects of dissolved oxygen in fruit juices and methods of removal. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 409–423.
- Golubitskil, G. B., Budko, E. V., Basova, E. M., Kostarnoi, A. V., & Ivanov, V. M. (2007). Stability of ascorbic acid in aqueous and aqueous-organic solutions for quantitative determination. *Journal of Analytical Chemistry*, 62(8), 742–747.
- Gomez-Ruiz, B., Roux, S., Courtois, F., & Bonazzi, C. (2016a). Degradation kinetics of vitamin C at different temperatures and concentrations of dissolved oxygen in a model solution. Part I. Simple model of ascorbic acid concentration. *Food Chemistry, A soumettre*.
- Gomez-Ruiz, B., Roux, S., Courtois, F., & Bonazzi, C. (2016b). Spectrophometric method for fast quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in simple matrix for kinetics measurements. *Food Chemistry, Soumis*.
- Gregory, J. F. (1985). Chemical changes of vitamins during food processing. In T. Richardson & J. W. Finley (Eds.), *Chemical changes in Food during Processing* (pp. 373–408). New York, USA: Springer US.
- Hasselmann, C., & Diop, P. A. (1983). Determination of L-ascorbic-acid in foods - A review(1976-1981). *Sciences Des Aliments*, 3(2), 161–180.
- Herrero-Martinez, J., Simo-Alfonso, E., Deltoro, V., Calatayud, A., & Ramis-Ramos, G. (1998). Determination of L-ascorbic acid and total ascorbic acid in vascular and nonvascular plants by capillary zone electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 265(2), 275-281.
- Hsu, H.-Y., Tsai, Y.-C., Fu, C., & Wu, J. S.-B. (2013). Degradation of ascorbic acid in ethanolic solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 10696–10701.
- Humeres, E., Quijano, J., & Sierra, M. (1990). A method to correct the pH and acid

- dissociation constants for weak aqueous acid solutions with temperature. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 1(3), 99–104.
- Institute-of-Medicine. (2000). *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Kalt, W. (2005). Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70(1), R11–R19.
- Kalus, W. H., & Filby, W. G. (1986). Loss of ascorbic acid during simulated industrial blanching experiments. *LWT - Food Science and Technology*, 19, 7–12.
- Klimczak, I., & Gliszczynska-Swiglo, A. (2015). Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chemistry*, 175, 100–105.
- Kurata, T., & Sakurai, Y. (1967). Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(2), 177–184.
- Laing, B. M., Schlueter, D. L., & Labuza, T. P. (1978). Degradation kinetics of ascorbic acid at high temperature and water activity. *Journal of Food Science*, 43(5), 1440–1443.
- Landete, J. M. (2013). Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 706–721.
- Lavelli, V., & Vantaggi, C. (2009). Rate of antioxidant degradation and color variations in dehydrated apples as related to water activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4733–4738.
- Leong, S. Y., & Oey, I. (2012). Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 133(4), 1577–1587.
- Lešková, E., Kubíková, J., Kováčiková, E., Košická, M., Porubská, J., & Holčíková, K. (2006). Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 252–276.
- Lin, S. H., & Agalloco, J. (1979). Degradation kinetics of ascorbic acid. *Process Biochemistry*, 14(9), 22–24.
- Liu, Y. Q., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530–545.
- López, J., Uribe, E., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Gonzalez, E., & Di Scala, K. (2010). Effect of air temperature on drying kinetics, vitamin C, antioxidant activity, total phenolic content, non-enzymatic browning and firmness of blueberries variety O'Neil. *Food and Bioprocess Technology*, 3(5), 772–777.
- Louarme, L., & Billaud, C. (2012). Evaluation of ascorbic acid and sugar degradation products during fruit dessert processing under conventional or ohmic heating treatment. *Food Science and Technology*, 49(2), 184–187.
- Manso, M. C., Oliveira, F. A. R., Oliveira, J. C., & Frias, J. M. (2001). Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice under aerobic conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(3), 303–312.

- Marfil, P. H. M., Santos, E. M., & Telis, V. R. N. (2008a). Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 41(9), 1642–1647.
- Marfil, P. H. M., Santos, E. M., & Telis, V. R. N. (2008b). Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 41(9), 1642–1647.
- Mazzeo, T., Paciulli, M., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., Ganino, T., & Pellegrini, N. (2015). Impact of the industrial freezing process on selected vegetables-Part II. Colour and bioactive compounds. *Food Research International*, 75, 89–97.
- Moeslinger, T., Brunner, M., & Spieckermeann, P. G. (1994). Spectrophotometric determination of dehydroascorbic acid in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 221, 290–296.
- Munyaka, A. W., Makule, E. E., Oey, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2010). Thermal Stability of L-Ascorbic Acid and Ascorbic Acid Oxidase in Broccoli (Brassica oleracea var. italica). *Journal of Food Science*, 75(4), C336–C340.
- Muratore, G., Rizzo, V., Licciardello, F., & Maccarone, E. (2008). Partial dehydration of cherry tomato at different temperature, and nutritional quality of the products. *Food Chemistry*, 111(4), 887–891.
- Nagy, S. (1980). Vitamin C contents of citrus fruit and their products: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 8–18.
- Nováková, L., Solich, P., & Solichová, D. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(10), 942–958.
- Odrizola-Serrano, I., Hernandez-Jover, T., & Martin-Belloso, O. (2007). Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry*, 105(3), 1151–1158.
- Oey, I., Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 300–308.
- Oey, I., Verlinde, P., Hendrickx, M., & Loey, A. V. (2006). Temperature and pressure stability of L-ascorbic acid and/or 6s 5-methyltetrahydrofolic acid: A kinetic study. *European Food Research and Technology*, 223(1).
- Park, Y. S., Im, M. H., Ham, K. S., Kang, S. G., Park, Y. K., Namiesnik, J., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Trakhtenberg, S. & Gorinstein, S. (2015). Quantitative assessment of the main antioxidant compounds, antioxidant activities and FTIR spectra from commonly consumed fruits, compared to standard kiwi fruit. *Lwt-Food Science and Technology*, 63(1), 346–352.
- Patil, B. S., Jayaprakasha, G. K., Murthy, K. N. C., & Vikram, A. (2009). Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8142–8160.
- Patkai, G., Kormendy, I., & Kormendy-Domina, A. (2002). Vitamin C decomposition kinetics in solutions, modelling citrus juices. *Acta Alimentaria*, 31(2), 125–127.
- Peleg, M., Normand, M. D., & Corradini. (2012). The Arrhenius equation revisited. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(9), 830–851.
- Pénicaud, C. (2009). *Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation*. Thèse de doctorat, Université Montpellier 2, Montpellier, France.
- Pénicaud, C., Bohuon, P., Peyron, S., Gontard, N., & Guillard, V. (2012). Influence of the experimental errors and their propagation on the accuracy of identified kinetics parameters: Oxygen and temper. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(3), 1131–1142.
- Pénicaud, C., Broyart, B., Peyron, S., Gontard, N., & Guillard, V. (2011). Mechanistic model to couple oxygen transfer with ascorbic acid oxidation kinetics in model solid food. *Journal of Food Engineering*, 104(1), 96–104.
- Pénicaud, C., Guillard, V., Peyron, S., & Gontard, N. (2009). Oxygen transfer coupled to oxidation reactions: Numerical tool for optimising nutritional quality of food. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, S28–S28.
- Pénicaud, C., Peyron, S., Bohuon, P., Gontard, N., & Guillard, V. (2010). Ascorbic acid in food: Development of a rapid analysis technique and application to diffusivity determination. *Food Research International*, 43(3), 838–847.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Serban, A. I., & Fafaneata, C. (2014). Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, 121, 443–460.
- Poiroux-Gonord, F., Bidel, L. P. R., Fanciullino, A. L., Gautier, H., Lauri-Lopez, F., & Urban, L. (2010). Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12065–12082.
- Ramesh, M. N., Wolf, T. D., & Jung, G. (2001). Influence of processing parameters on the drying of spice paprika. *Journal of Food Engineering*, 49, 63–72.
- Rickman, J. C., Barrett, D. M., & Bruhn, C. M. (2007). Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. vitamins C and B and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 930–944.
- Robertson, G. L., & Samaniego, C. M. L. (1986). Effect of initial dissolved oxygen levels on the degradation of ascorbic acid and the browning of lemon juice during storage. *Journal of Food Science*, 51(1), 184–187.
- Rodriguez, M., Sadler, G. D., Sims, C. A., & Braddock, R. J. (1991). Chemical changes during storage of an alcoholic juice beverage. *Food Science*, 56(2), 475–479.

- Rogers, A. R., & Yacomini, J. A. (1971). The effect of pH on the aerobic degradation of ascorbic acid solutions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 23, 218 S.
- Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (1997a). Ascorbic acid destruction in sweet aqueous model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 567–572.
- Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (1997b). Influence of system composition on ascorbic acid destruction at processing temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 369, 369–378.
- Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2001). Ascorbic acid destruction in aqueous model systems: an additional discussion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(15), 1433–1439.
- Ryley, J., & Kajda, P. (1994). Vitamins in thermal processing. *Food Chemistry*, 49(2), 119–129.
- Sablani, S. S. (2006). Drying of fruits and vegetables: Retention of nutritional/functional quality. *Drying Technology*, 24(2), 123–135.
- Santos, P. H. S., & Silva, M. A. (2008). Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables: A review. *Drying Technology*, 26, 1421–1437.
- Sarkar, N., Srivastava, P. K., & Dubey, V. K. (2009). Understanding the language of vitamin C. *Current Nutrition and Food Science*, 3(1), 53–55.
- Serpen, A., & Gokmen, V. (2007). Reversible degradation kinetics of ascorbic acid under reducing and oxidizing conditions. *Food Chemistry*, 104(2), 721–725.
- Shah, V. P., Midha, K. K., Dighe, S., McGliveray, I. J., Sekelly, J. P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, E.C., McDowall, R.D., Pittman, K.A. & Spector, S. (1992). Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 82, 1–7.
- Shashirekha, M. N., Mallikarjuna, S. E., & Rajarathnam, S. (2015). Status of bioactive compounds in foods, with focus on fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(10), 1324–1339.
- Singh, R. P., Heldman, D., & Kirk, J. (1976). Kinetics of quality degradation: Ascorbic acid oxidation in infant formula during storage. *Journal of Food Science*, 41, 304–307.
- Solomon, O., & Svanberg, U. (1995). Effect of oxygen light on the quality of orange juice during storage at 8°C. *Food Chemistry*, 53, 363–368.
- Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., & Castilho, P. C. (2014). Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. *Journal of Chromatography A*, 1369, 2–17.
- Spínola, V., Mendes, B., Câmara, J. S., & Castilho, P. C. (2013). Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 489–495.
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147–156.

- Szultka, M., Buszewska-Forajta, M., Kaliszan, R., & Buszewski, B. (2014). Determination of ascorbic acid and its degradation products by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Electrophoresis*, 35(4), 585–592.
- Takayanagi, T., Nishiuchi, M., Ousaka, M., Oshima, M., & Motomizu, S. (2009). Monitoring of vitamin C species in aqueous solution by flow injection analysis coupled with an on-line separation with reversed-phase column. *Talanta*, 79(4), 1055–1060.
- Tikekar, R. V, Anantheswaran, R. C., Elias, R. J., & LaBorde, L. F. (2011). Ultraviolet-induced oxidation of ascorbic acid in a model juice system: identification of degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8244–8248.
- Uddin, M. S., Hawlader, M. N. A., Ding, L., & Mujumdar, A. S. (2002). Degradation of ascorbic acid in dried guava during storage. *Journal of Food Engineering*, 51, 21–26.
- Van Boekel, M. (2008). Kinetic modeling of food quality: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 144–158.
- Van Boekel, M. (2009). *Kinetic modeling of reactions in food*. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- Van Bree, I., Baetens, J. M., Samapundo, S., Devlieghere, F., Laleman, R., Vandekinderen, I., Nosedá, B., Xhaferi, R., De Baets, B. & De Meulenaer, B. (2012). Modelling the degradation kinetics of vitamin C in fruit juice in relation to the initial headspace oxygen concentration. *Food Chemistry*, 134(1), 207–214.
- Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L., Weemaes, C., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (1998). Kinetics for isobaric - isothermal degradation of L -ascorbic acid. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 8561(97), 2001–2006.
- Vernin, G., Chakib, S., Rogacheva, S. M., Obretenov, D., & Cyril, P. (1998). Thermal decomposition of ascorbic acid. *Carbohydrate Research*, 305, 1–15.
- Vieira, M. C., Teixeira, A. A., & Silva, C. L. M. (2000). Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. *Journal of Food Engineering*, 43(1), 1–7.
- Wilson, R. J., Beezer, A. E., & Mitchell, J. C. (1995). A kinetic study of the oxidation of L-ascorbic acid (vitamin C) in solution using an isothermal microcalorimeter. *Thermochimica Acta*, 6031(95), 27–40.
- Winkler, L. W. (1888). Die Bestimmung des in wasser gelösten sauerstoffes berichte der deutschen chemischen gesellschaft, 21(2), 2843–2855.
- Yang, T.-S., & Min, D. B. (2009). Quenching mechanism and kinetics of ascorbic acid on the photosensitizing effects of synthetic food colorant FD&C red Nr 3. *Journal of Food Science*, 74(9), C718–C722.
- Yuan, J., & Chen, F. (1998). Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 46, 5078–5082.

Annexes

ANNEXE 1 : Tableau de Winkler

Solubilité de l'oxygène dans l'eau à différentes températures

Température (°C)	Solubilité O ₂ (mg/L)	Température (°C)	Solubilité O ₂ (mg/L)	Température (°C)	Solubilité O ₂ (mg/L)
0	14,56	34	7,02	68	3,99
1	14,16	35	6,91	69	3,9
2	13,78	36	6,8	70	3,81
3	13,42	37	6,7	71	3,71
4	13,06	38	6,6	72	3,62
5	12,73	39	6,5	73	3,52
6	12,41	40	6,41	74	3,43
7	12,11	41	6,31	75	3,32
8	11,81	42	6,22	76	3,23
9	11,52	43	6,12	77	3,13
10	11,25	44	6,03	78	3,03
11	10,99	45	5,94	79	2,92
12	10,75	46	5,85	80	2,81
13	10,5	47	5,76	81	2,7
14	10,28	48	5,67	82	2,59
15	10,06	49	5,59	83	2,43
16	9,85	50	5,5	84	2,36
17	9,65	51	5,42	85	2,24
18	9,45	52	5,34	86	2,12
19	9,26	53	5,26	87	1,99
20	9,09	54	5,18	88	1,86
21	8,9	55	5,1	89	1,73
22	8,73	56	5,02	90	1,59
23	8,58	57	4,93	91	1,45
24	8,42	58	4,85	92	1,31
25	8,26	59	4,77	93	1,16
26	8,06	60	4,69	94	1,01
27	7,91	61	4,6	95	0,86
28	7,77	62	4,52	96	0,69
29	7,63	63	4,43	97	0,52
30	7,49	64	4,34	98	0,36
31	7,37	65	4,26	99	0,18
32	7,25	66	4,17	100	0
33	7,13	67	4,08		

ANNEXE 2 : Outils pour la validation des méthodes.

Afin de valider la méthode de dosage de l'acide ascorbique, la méthode décrite par Feinberg en 2010 a été utilisée. Elle permet de déterminer la fidélité, la justesse, la linéarité et les incertitudes.

Choix du domaine

Le choix du domaine d'application peut correspondre à une obligation légale. Par exemple, dans le domaine pharmaceutique, il faut prendre en compte les domaines minimums suivants :

Pour les substances pures ou les spécialités pharmaceutiques, le domaine doit couvrir entre 80 et 120% de la concentration cible.

Pour une vérification de concentration continue, le domaine doit s'étendre entre 70 et 130 % de la concentration attendue.

Dans notre cas, puisque nous avons une molécule pure à doser dans une matrice très simple mais avec une concentration qui évolue, nous allons donc nous attacher à valider la méthode sur un domaine compris entre 0 et 120% de la concentration maximale que nous sommes susceptibles de rencontrer dans nos échantillons.

Test de linéarité

La linéarité est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une réponse instrumentale ou des résultats directement proportionnels à la quantité d'analyte à doser dans l'échantillon.

Le test de linéarité permet de vérifier la validité du modèle de régression, de vérifier le domaine d'étalonnage et d'en déduire les caractéristiques de l'étalonnage. La régression est jugée acceptable si le modèle explique bien les variations des valeurs d'information. Le

domaine d'étalonnage est jugé acceptable s'il n'existe pas une erreur de modèle significative (pas de courbure).

Un test de linéarité se compose de plusieurs étapes. Tout d'abord, il faut choisir le domaine sur lequel on souhaite établir la linéarité. Ensuite, il faut réaliser p solutions étalons de concentrations régulièrement réparties sur le domaine choisi (minimum 5 solutions). Puis, il faut faire n répétitions du dosage (minimum 5 répétitions) de chacune des p solutions. Le nombre total de mesures ($n \times p$) est noté N . Enfin, il est possible de réaliser les calculs statistiques et de déterminer si la réponse au dosage sur le domaine choisi est bien linéaire.

Analyse de Variance

La méthode proposée pour réaliser cette vérification utilise des concepts introduits par la méthode de moindres carrés. La recherche de la linéarité met en œuvre un test d'erreur d'adéquation du modèle basé sur l'analyse de variance. Ce test consiste à décomposer la somme des carrés des écarts (SCE) des réponses, notée SCE_y , en différentes SCE .

La décomposition de SCE_y est exprimée par l'équation 1.

$$SCE_y = SCE_l + SCE_{nl} + SCE_r \quad (1)$$

Où :

SCE_l est la somme des carrés des écarts due à la régression qui sera interprété comme mesure de la linéarité.

SCE_{nl} est la somme des carrés des écarts due à une erreur de modèle qui sera interprété comme mesure de la non-linéarité.

SCE_r est la somme des carrés des écarts résiduelle.

Le calcul des différentes SCE est réalisé de la manière suivante.

Somme des carrés des écarts résiduels.

$$SCE_r = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{ni} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (2)$$

Où y_{ij} est la mesure de réponse dans la série « i » et la répétition « j » et \bar{y}_i est la moyenne des répétitions dans la série « i ».

Somme des carrés des écarts dus à la linéarité (régression)

$$SCE_l = \frac{SPE_{xy}^2}{SCE_x} \quad (3)$$

Somme des produits des écarts

$$SPE_{xy} = \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y}) \quad (4)$$

Où x_{ij} est la mesure de référence dans la série « i » et la répétition « j » et \bar{x} et \bar{y} sont les moyennes des mesures de référence et des réponses obtenues respectivement.

Somme des carrés des écarts à la moyenne pour x

$$SCE_x = \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x})^2 \quad (5)$$

Somme des carrées des écarts dus à la non-linéarité ou à l'erreur de modèle

$$SCE_{nl} = SCE_y + SCE_r + SCE_l \quad (6)$$

Somme des carrés des écarts à la moyenne pour y

$$SCE_y = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (7)$$

Les résultats obtenus de l'analyse de la variance d'une gamme d'étalonnage peuvent être synthétisés de la manière suivante :

La source de variation par la régression (V) est définie pour la somme des carrés des écarts due à la linéarité avec 1 degré de liberté.

$$V_l = SCE_l \quad (8)$$

La valeur de Fisher est déterminée par l'équation suivante :

$$F_l = V_l / V_{nl} \quad (9)$$

La variation de l'erreur du modèle (V_{nl}) est définie par l'équation suivante :

$$V_{nl} = SCE_{nl} / p - 2 \quad (10)$$

Où p est le nombre de solutions testées et $p-2$ est le nombre de degrés de liberté.

La valeur de Fisher est calculée de la manière suivante :

$$F_{nl} = V_{nl} / V_r \quad (11)$$

La variance de l'erreur résiduelle (V_r) est déterminée par l'équation suivante :

$$V_r = SCE_r / p(n-1) \quad (12)$$

Où p est le nombre de niveaux, n est le nombre de répétitions, N est le nombre total de mesures et $p(n-1)$ est le nombre de degrés de liberté.

Hypothèses de linéarité.

Les résultats obtenus au cours de l'analyse de la variance doivent ensuite être confrontés à la valeur lue dans la table de Fisher pour le risque de première espèce (α) choisi et pour les degrés de liberté par rapport à la régression (DDL1) et par rapport à la l'erreur résiduelle (DDL2), notée $F_{\alpha;DDL1;DDL2}$. Dans notre cas, α est fixé à 0,01.

Test de la linéarité

- Si $F_l > F_{0,01;1;N-p}$ le modèle de régression peut être considéré comme acceptable.
- Si $F_l \leq F_{0,01;1; N-p}$ la méthode ne peut pas être acceptable.

Test de la non-linéarité

- Si $F_{nl} \leq F_{0,01;p-2;N-p}$, le domaine de linéarité choisi peut alors être validé.
- Si $F_{nl} > F_{0,01;p-2;N-p}$ le domaine d'étalonnage choisi n'est pas linéaire et il faut réduire son étendue. Le ou les points de gamme à supprimer devront se situer aux extrémités haute

et/ou basse de la gamme. Le nombre de points de gamme restant ne doit pas être inférieur à 5.

Limites de détection et de quantification

La limite de détection (X_{LD}) est définie comme la plus petite concentration de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée, avec un risque d'erreur connu.

La limite de quantification (X_{LQ}) est la plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifiée, avec un risque d'erreur connu.

A partir des calculs précédemment effectués pour le test de linéarité, il est possible de calculer la sensibilité du modèle (pente) a_1 , le blanc (ordonnée à l'origine) a_0 , son écart type s_{a0} , ainsi que les limites de détection X_{LD} et de quantification X_{LQ} .

Sensibilité ou pente

$$a_1 = \frac{SPE_{xy}}{SCE_x} \quad (13)$$

Blanc analytique ou ordonnée à l'origine.

$$a_0 = \bar{y} - a_1 \bar{x} \quad (14)$$

Variance expérimentale

$$s^2 = \frac{SCE_y - (a_1 \times SPE_{xy})}{np - 2} \quad (15)$$

Ecart type du blanc

$$s_{a0} = \sqrt{s^2 \times \left(\frac{1}{np} + \frac{(\bar{x})}{SCE_x} \right)} \quad (16)$$

Limite de détection

$$X_{LD} = \frac{a_0 + 3s_{a0}}{a_1} \quad (17)$$

Limite de quantification

$$X_{LQ} = \frac{a_0 + 10s_{a0}}{a_1} \quad (18)$$

Fidélité

La fidélité de la méthode va être définie par la répétabilité (r) et la reproductibilité (R). La répétabilité est l'écart maximum (calculé d'après les écarts-types) au niveau de confiance 95%, entre deux résultats obtenus selon les conditions de répétabilité qui ont été fixées (1 expérimentateur, 1 lot de solutions et 1 jour).

La reproductibilité est l'écart maximum au niveau de confiance 95% entre deux résultats obtenus sur un échantillon commun selon les conditions de reproductibilité qui ont été fixées (même expérimentateur, différents lots de solutions, différents jours).

Les calculs de la répétabilité et de la reproductibilité sont déterminés par le modèle statistique d'analyse de variance à un seul facteur à effet aléatoire, représenté par l'équation 19.

$$SCE_t = SCE_L + SCE_r \quad (19)$$

SCE_t est la somme totale des carrés des écarts à la moyenne (reproductibilité)

SCE_L est la somme des carrés des écarts inter-labo ou factorielle

SCE_r est la somme des carrés des écarts résiduelle.

Pour valider une méthode il faut que les coefficients de variation de répétabilité (CV_r) et de reproductibilité (CV_R) soient inférieurs à une valeur de tolérance, par exemple 10%.

La détermination des sommes, des variances et des coefficients de variation de la répétabilité et de la reproductibilité est réalisée de la manière suivante :

Somme totale

$$SCE_t = \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{\bar{x}})^2 = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}^2 - \frac{(\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij})^2}{N} \quad (20)$$

Somme intra-labo ou répétabilité

$$SCE_L = \sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}^2 - \frac{(\sum_{j=1}^{n_i} x_{ij})^2}{n_i} \right) \quad (21)$$

Nombre moyen corrigé du nombre de répétitions par jour

$$N' = N - \frac{\sum_{i=1}^p n_i^2}{N} \quad (22)$$

Variance de répétabilité estimée

$$s_r^2 = \frac{SCE_{rx}}{N - p} \quad (23)$$

Variance inter-labo estimée

$$s_L^2 = \frac{(p - 1) \left[\frac{SCE_L}{p - 1} - s_r^2 \right]}{N'} \quad (24)$$

Variance de reproductibilité estimée

$$s_R^2 = s_L^2 + s_r^2 \quad (25)$$

Coefficient de variation de la répétabilité

$$CV_r = 100 \frac{s_r}{\bar{x}} \quad (26)$$

Coefficient de variation de la reproductibilité

$$CV_R = 100 \frac{s_R}{\bar{x}} \quad (27)$$

Justesse

Le calcul de la justesse d'une méthode permet de caractériser la différence obtenue entre la valeur déterminée expérimentalement et la valeur vraie de l'échantillon. Il est possible de l'exprimer suivant plusieurs critères et notamment sous la forme d'un biais. Ces critères sont les suivants :

Biais absolu

$$b_{ijk} = z_{ijk} - x_{ijk} \quad (28)$$

Recouvrement

$$Recouvrement = \frac{z_{ijk}}{\bar{x}_k} \times 100 \quad (29)$$

Où x_{ijk} est la concentration théorique et z_{ijk} est la concentration retrouvée.

Calcul de la justesse et de la fidélité par niveau

Les critères de fidélité sont calculés pour un niveau (k) et non pour une mesure individuelle et ils sont exprimés pour les équations suivantes :

Ecart-type de fidélité intermédiaire

$$s_{FI} = \sqrt{s_{kr}^2 + s_{kR}^2} \quad (30)$$

Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire

$$\frac{s_{FI}}{\bar{X}_k} \times 100 \quad (31)$$

Où \bar{X}_k est la valeur de référence moyenne, s_{kr} est l'écart-type de répétabilité et s_{kR} l'écart-type de reproductibilité.

Title : Prediction of vitamin C degradation in heat treatment conditions: study in model liquid medium between 50 and 90°C

Keywords : Vitamin C, analytical method, validation, oxygen, reaction kinetics and modelling

Abstract :

Vitamin C is often used as an indicator of labile nutrient retention in processed products because of its sensitivity to processing and conservation conditions. Understanding the behavior of vitamin C in complex matrices transformation processes is difficult, due to the importance of several parameters that affect its degradation (temperature, pH, exposure to light, the presence of oxygen and metal catalysts). Studying reactivity in a simple environment of known composition, under controlled conditions, is necessary for a better understanding of the mechanisms and for modelling in order to predict the impact of process parameters on the residual vitamin content. The present research aims at contributing to this goal for temperatures of a transformation process (50 - 90 °C), while decoupling the effect of concentration of dissolved oxygen (between 0 and 30%). To achieve this, a simple and rapid method of quantification of ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic (DHAA) was first developed and validated. It allowed obtaining a reaction database for different couples of temperature and oxygen concentration, in a buffered and perfectly stirred medium. Two kinetic models were developed: a simple reaction model to predict the degradation of AA, and a more complex model taking into consideration both oxidative and thermal degradation pathways on the degradation kinetics of AA and DHAA. Both models show a good fit to experimental data and a strong correlation between k_1 reaction rate of the oxidation reaction and the stoichiometric coefficient β relative to oxygen. A linear relationship between β and temperature was also proposed.

Titre : Prediction de la dégradation de la vitamine C en conditions de traitement thermique: étude en milieu modèle liquide entre 50 et 90°C

Mots clés : Vitamine C, méthode analytique, validation, oxygène, réactions cinétiques, modèle

Résumé :

La vitamine C est souvent utilisée comme un indicateur de la rétention de nutriments thermolabiles dans les produits transformés en raison de sa grande sensibilité aux conditions de traitement et de conservation. La compréhension du comportement de la vitamine C dans les procédés de transformation des matrices complexes est difficile, du fait de l'importance de plusieurs paramètres qui influent sur sa dégradation (température, pH, exposition à la lumière, présence d'oxygène et d'ions métalliques). L'étude de la réactivité dans un milieu simple, de composition connue, dans des conditions maîtrisées, est indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes et à une modélisation permettant de prédire l'impact des paramètres de procédés sur la teneur résiduelle. Ce travail de recherche contribue à cette ambition pour des températures représentatives d'un procédé de transformation (50 - 90 °C), tout en dissociant l'effet de la concentration en oxygène dissous (entre 0 et 30%). Pour y parvenir, une méthode simple et rapide de quantification des acides ascorbique (AA) et déshydroascorbique (DHAA) a été développée et validée. Elle a permis l'obtention d'une base de données réactionnelles pour différents couples température et concentration en oxygène, en milieu tamponné et parfaitement agité. Deux modèles cinétiques ont été développés : un modèle simple permettant de prédire la dégradation de l'AA et un modèle complexe prenant en considération les deux voies de dégradation oxydative et thermique sur les cinétiques de dégradation de l'AA et du DHAA. Les deux modèles montrent un bon ajustement aux données expérimentales et une forte corrélation entre la vitesse de réaction k_1 de la réaction d'oxydation et le coefficient stœchiométrique β relatif à l'oxygène. Une relation linéaire reliant β à la température a été proposée.