

SQUALENE/SQUALANE

P. Jame, H. Casabianca, M. Batteau, P. Goetinck, V. Salomon*

Rozróżnienie pochodzenia skwalenu i skwalanu przy użyciu analizy stabilnych izotopów

Abstrakt

Skwalan jest szeroko stosowany w produktach kosmetycznych. Skwalan jest otrzymywany na skalę przemysłową przez uwodornienie naturalnie występującej cząsteczki skwalenu.

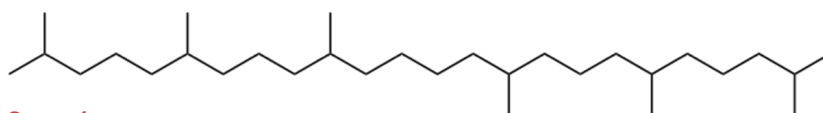
Skwalen uzyskuje się z dwóch odrębnych źródeł - oleju z wątroby rekina i frakcji niezmydlających oliwy z oliwek. Zarówno skwalen i skwalan z obu źródeł są chemicznie identyczne, ale różnią się w czystości i kosztach produkcji.

Celem pracy jest stworzenie w pełni aktualnej metody określania pochodzenia zarówno skwalenu i skwalanu. Aby ten cel osiągnąć została wykorzystana, izotopowa spektrometria masowa. Stabilne izotopy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ zostały oznaczone przy użyciu analizatora elementarnego (EA) połączonego ze spektrometrem masowym (IMRS). Przebadano próbki mieszanek skwalenów różnego pochodzenia., podobne badanie przeprowadzono dla skwalanów, w badaniu określono stosunek ilościowy izotopów węgla.

Wyniki wskazują, że zarówno dla skwalenu i skwalanu, istnieją znaczne różnice w wartościach $\delta^{13}\text{C}$ zależnie od pochodzeniem z rekina (-19,4 ‰) czy z oliwy (-28,3 ‰). Tak więc nie występuje frakcjonowanie izotopowe podczas reakcji przekształcania skwalenu w skwalan. Stwierdza się, że analizy przez wartości $\delta^{13}\text{C}$ stanowią ważną metodę ilościową odróżniania pochodzenia skwalenu i skwalanu.

Wprowadzenie

Skwalan jest w pełni nasyconym węglowodorem, $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$. Nie występuje w naturze. Jest to idealnie stabilny olej, bezbarwny i bezwonny. Pozostaje płynny w niskiej temperaturze.



Squalane structure

$\text{C}_{30}\text{H}_{62}$

INCI

Squalane

2, 6, 10, 15, 19, 23-Hexamethyltetracosane

CAS 111-01-3

EINECS 203-825-6

Skwalan jest szeroko stosowany w kosmetyce od wielu lat. Jest to doskonały olej zmiękczący i ceniony w zastosowaniach kosmetycznych ze względu na wyjątkowe jedwabiste odczucia na skórze jakich dostarcza.

Skwalan posiada właściwości nawilżające, działa zmiękcząco na naskórek, przyczynia się do redukcji zmarszczek i korzystnie oddziałuje na ogólną kondycję skóry.

Skwalan jest idealnym składnikiem preparatów przeznaczonych do regeneracji suchej i zniszczonej skóry.

Skwalan łatwo rozprowadza się i szybko się wchłania w warstwie naskórka nie pozostawiając tłustego lub lepkiego filmu na powierzchni.(1).

Skwalan jest stabilny w szerokim zakresie temperatur oraz jest zgodny z większością składników kosmetycznych takimi jak: oleje roślinne, estry, olejami

mineralnym

i syntetycznymi, woskami itp.

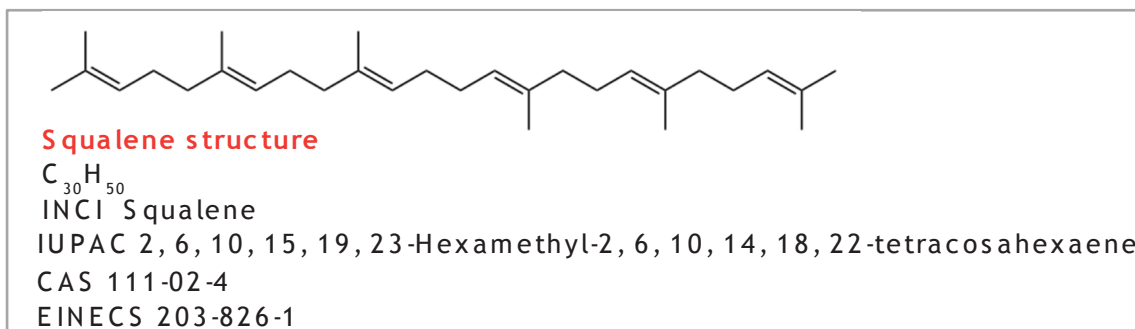
Łatwo formuje kosmetyczne emulsje o drobnych cząstkach.

Skwalan jest wyjątkowym niepolarnym środkiem zmiękcającym pochodzenia naturalnego.

Skwalan jest otrzymywany na skalę przemysłową przez pełne katalityczne uwodornienie naturalnie występujących cząsteczek - skwalenu.

Reakcję uwodorniania prowadzi się pod wysokim ciśnieniem (> 10 bar).

Katalizatorami zazwyczaj stosowanymi w przemyśle są katalizatory z metali (szczególnie pallad / węgiel i nikiel / tlenek niklu). W trakcie reakcji katalitycznej wydziela się znaczna ilość ciepła (reakcja egzotermiczna).



Cząsteczka Skwalenu została odkryta przez japońskiego chemika Mitsumaru Tsujimoto w 1906 roku jako główny składnik oleju z wątroby niektórych gatunków głębinowych rekinów. Obraz molekularny skwalenu został opublikowany przez Paula Karrera w 1936 roku.

Skwalen jest wysoce nienasyconym węglowodorem z rodziny triterpenoidów, składającym się z sześciu izolowanych wiązań podwójnych. Jest to olej o niskiej lepkości. Po oczyszczeniu jest barwy jasnożółtej do bezbarwnej, prawie pozbawiona zapachu.

We wczesnych latach 1950, wykazano, że Skwalen występuje w znaczących ilościach w ludzkim łój. Jest naturalnym składnikiem lipidów skóry człowieka, To wskazało na istotny związek między Skwalenem i hydrolipidową równowagą skóry.

Skwalen odgrywa kluczową rolę w fizjologii skóry. Pomaga on w utrzymaniu prawidłowego nawilżenia, regeneruje uszkodzoną skórę i przyczynia się do powolnienia procesów starzenia się skóry. Skwalen pełni znaczną rolę w ochronie przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi, takimi jak np. promieniowanie UV.

(2).

Skwalen jest również wykorzystywany jako skuteczny nośnik dla aktywnych cząsteczek w szczepionkach (3).

W naturze skwalen w znacznych ilościach występuje w:

- ludzkim łój
- oleju z wątroby rekina
- tłuszczach pochodzenia roślinnego.

Łój człowieka

Skwalen występuje naturalnie w łój na poziomie 8 - 25%, w zależności od wieku, płci, czynników środowiska, itp.

Skwalen jest produkowany naturalnie w procesie syntezy cholesterolu. Jego największe stężenie występuje w skórze, jest składnikiem wydzieliny gruczołów łojowych, pomaga tworzyć barierę ochronną na powierzchni skóry.

Ilość skwalenu w łój spada z wiekiem (4).

Olej z wątroby rekina

Skwalen jest obecny w wysokim stężeniu (35 - 80%) w oleju z wątroby niektórych gatunków rekinów głębinowych. Rekiny te są stosunkowo małe (ok. 1 m) i są doskonale przystosowane do siedliska - głębokości ponad 1000 m.

Zainteresowanie skwalenem a w szczególności skwalanem do celów kosmetycznych znacznie wzrosło w ciągu ostatnich 40 lat.

Przez większość tego okresu, olej z wątroby rekina stanowił jedyne źródło skwalenu w skali przemysłowej. Intensywne połowy rekinów doprowadziły do znacznego zmniejszenia ich populacji

i w konsekwencji wiele gatunków jest zagrożonych całkowitym wyginięciem.

Dlatego olej z wątroby rekina (jako surowiec do produkcji skwalenu i skwalanu) nie może być uznany jako surowiec odnawialny. W interesie ochrony różnorodności biologicznej, surowce pochodzenia zwierzęcego muszą zostać zastąpione przez alternatywne źródła.

Pochodzenie roślinne

Skwalen jest powszechnie obecny jako składnik frakcji niezmydlającej się olejów roślinnych. Jednak ogólnie rzecz biorąc, poziom skwalenu w olejach roślinnych jest bardzo niski, dlatego większość olejów roślinnych nie stanowi realnego źródła skwalenu do celów przemysłowych.

Jedynie w przypadku oliwy z oliwek (*Olea europaea*), która jest przetwarzana w olbrzymich ilościach, istnieje możliwość pozyskiwania skwalenu mimo że jego zawartość w oliwie stanowi ułamek procenta. W trakcie procesu rafinacji następuje kondensacja frakcji niezmydlających się, co stanowi podstawę do pozyskiwania skwalenu na skalę przemysłową.

Produkcja przemysłowa skwalenu z oliwek jest procesem znacznie bardziej złożonym w porównaniu do procesu bazującego na oleju z wątroby rekina.

Ma to znaczący wpływ na koszty oleju skwalenowego i skwalanu, które są znacznie wyższe w porównaniu kosztów skwalenu uzyskanego z oleju z wątroby rekina.

Inne źródła

Olej jaśminowy (*Jasminum grandiflorum*) jest szeroko stosowany w kompozycjach zapachowych (konkrety i absoluty). Zawartość skwalenu zawiera się w zakresie od 2,5 do 6%, tlenek skwalenu

jest także w zakresie od 5 do 12%. Jasmin nie jest wykorzystywany jako źródło skwalenu ze względu na bardzo wysokie koszty (5).

Amarantus (*Amaranthus* sp.) zawiera również znaczne ilości skwalenu (6).

W zależności od odmiany olej uzyskana z nasion może zawierać do 8% skwalenu.

Lipidowy wyciąg z liści ma średnie stężenie skwalenu 0,26%, które jest niewystarczające dla produkcji przemysłowej.

Ci sami autorzy raportu piszą o optymalizacji ekstrakcji nadkrytycznej, która umożliwia uzyskania frakcje zawierające 15% skwalenu (7).

Pochodzenie syntetyczne

Syntetyczny skwalen: W 1983 roku synteza skwalanu została opisana przez japońskich autorów (8). Następnie przez krótki okres ten produkt został wprowadzony do obrotu pod nazwą

skwalan SK. Wydaje się, że ze względu na wysokie koszty produkcja nie jest kontynuowana.

Ocena pochodzenia

Izotopowa spektrometria masowa (IRMS) jest dobrze znana i szeroko stosowaną metodą

sprawdzania autentyczności. Proporcje stabilnych izotopów w molekułach są bezpośrednio związane z ich pochodzeniem (roślinne, zwierzęce, kopalne, syntetyczne). W przypadku żywych

organizmów roślinnych, włączenie węgla niezbędnego do metabolizmu regulowane jest przez trzy wyraźnie różne cykle fotosyntezy (C3, C4 i CAM) z wykorzystaniem różnych lub zmiennych tras i procesów enzymatycznych (9-13).

Wynikowe izotopowe różnicowanie daje składnikom roślinnym unikalny podpis izotopowy, który pozwala na odróżnienie (w większości przypadków) procesów syntezy (petrochemiczny, biotechnologii), jak również pochodzenia geograficznego (wpływ gleby i warunków klimatycznych w fotosyntezie).

Tak więc badanie izotopowe jest skutecznym środkiem kontroli pochodzenia i autentyczności produktów (14-17).

W przypadku oliwy z oliwek, badania wskazują na możliwość wykrywania dodania tanich olejów roślinnych poprzez pomiar stosunków izotopów w kwasach tłuszczowych otrzymanych przez zmydlanie. Zakres $\delta^{13}\text{C}$ (-28,1 do -36,5 ‰) charakterystyczny dla metabolizmu Calvina (C3) pokazuje dyspersję, która może być przypisana do różnych odmian oliwek i do warunków klimatycznych i glebowych.

Izotopowa spektrometria masowa (IRMS) jest w stanie wykryć drobne zmiany, które pozwalają sprawdzić pochodzenie środków spożywczych takich jak np. dzikie lub hodowlane ryby (łosoś z Atlantyku, Pacyfiku, okoń morski, leszcz morski). Faktycznie specyfika zaopatrzenia w żywność (małych ryb, mączki rybnej) wynika, w szczególności ze stosunku izotopowego azotu ($^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$), stanowiącego znacznik, który jest wyraźnym oznaczeniem pochodzenia geograficznego lub hodowli ryb (18-20).

Multi-izotopowa analiza (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) może być skutecznym środkiem, aby potwierdzić jeszcze dokładniej różnice gatunków i pochodzenia geograficznego dla dzikich i hodowlanych ryb (21-23).

Eksperyment

Sprzęt

Oprzężenie

Sprzęt używany do określenia $\delta^{13}\text{C}$ czystych materiałów składa się z elementarnego analizatora węgla, azotu (instrumenty SCA, Solaize CNRS, Francja) podłączony do spektrometru masowego izotopu Delta S (Thermo, Brema, Niemcy).

Próbki ważone w srebrnych kubkach są natychmiast wprowadzane do jednostki spalania w 1050°C przy przepływie gazu 40 ml He i 5 ml O_2 a potem do drugiego pieca w temperaturze 850°C , zawierającego tlenek miedzi. Elementy węgla, wodoru i azotu przekształcane są na dwutlenek węgla, wodę i tlenki azotu. Gazy prowadzone przez hel są na początku skierowane przez jednostkę zawierającą miedź w temperaturze 450°C , która wywołuje redukcję tlenków azotu na azot i zachowuje nadmiar tlenu, a następnie przez rurkę zawierającą bezwodny nadchloran magnezu aby zachować wodę.

Azot i dwutlenek węgla są oddzielone w kolumnie chromatograficznej (Hayesep QP / W 60/80L: 3,5 m D: 1 / 4 cala - Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, Francja) a następnie wstrzykiwane za pomocą interfejsu Online Finnigan do źródła izotopowego spektrometru masowego Delta S.

Izotopowy stosunek $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ mierzy się poprzez masy Delta S 44, 45 i 46. Wynik wyrażony jest w jednostkach izotopowych Delta ^{13}C według następującego wzoru:

$$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ próbka } (R^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ próbka} / R^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ standard} -1) * 1000$$

Międzynarodowy standard Delta 13C/12C jest znany jako węglan PDB »Pee Dee Belemnita". Pomiary izotopowe są wykonane w stosunku do normy zewnętrznej (butla z CO₂) kalibrowanej

w odniesieniu do międzynarodowego standardu węglanu. Metoda ta jest weryfikowana przez

stosowanie standardowych substancji odniesienia PEF1, NBS 22, sacharoza ANU, dostarczonych przez Międzynarodową Agencję Energii Atomowej w Wiedniu, Austria. Niepewność (błąd) metody jest mniejsza niż 0,30 ‰.

Sprzęt używany do analizy izotopowej ¹³C mieszanek (olejki eteryczne, amarantus) składa się z chromatografu gazowego 6890N (Agilent Technology), podłączonego do linii spalania (GC5MK1) i izotopowego spektrometru masowego Isoprime (Elementar, Hanau, Niemcy) . Chromatograf gazowy wyposażony jest w kolumnę J & W DB-xlb (30 * 0,25 mm * 0.25µm). Warunki pracy: iniekcja 1 µl podział 20 (260 ° C), program temperatury 150-290 ° C przy wzroście 10 ° C na minutę, a następnie 10 mn przy 290 ° C, przepływ He 2 ml / mn.

Próbki o znanym pochodzeniu przedstawiono w tabeli 1.

Lp	Przeznaczenie	Dostawca	wartości δ 13C ‰
1	skwalan - żarłacza	Barnet Products	-20,94
2	skwalan - żarłacza	Nikko	-20,13
3	skwalan - oliwa	Barnet Products	-28,43
4	skwalan - oliwa	Nikko	-28,35
5	skwalan - oliwa	CRM international	-28,25
6	skwalen - żarłacza	Barnet Products	-20,44
7	kwalan - oliwa	CRM international	-28,1
8	olej z substancji niezmydlających	CRM international	-28,26
9	skwalen - syntetyczny	Kuraray (Barnet Products)	-26,69
10	skwalen - jaszmin	Laboratoire Monique Rémy	-27,1
11	skwalen - amarant	CRM international	-14,9
12	skwalen - amarant	Flavex	-15,4

Tabela 1 Próbki znanego pochodzenia

Wyniki i dyskusja

Wyniki wskazują jednoznacznie izotopowa różnicę między dwoma nadrzędnymi źródłami skwalenu (zwierzęcego i roślinnego). Wartości uzyskane dla materiału rekina posiadają o wiele większą wartość izotopową w δ 13C (delta mniej negatywne). To jest mocno związane z wartościami izotopowymi obserwowanymi dla ryb morskich (18, 19). Łańcuch pokarmowy organizmów morskich: fitoplankton - małe ryby - duże ryby, powoduje wzrost izotopowy gdy duże drapieżniki są porównywane do planktonowego źródła żywności znanego jako bardzo ubogie w δ¹³C (-30 do -40 ‰). Jest więc uzasadnione, aby uznać że gatunki rekinów i pochodzenie geograficzne (temperatura wody i strefy połowów) mają wpływ na izotopowe wartości. Niestety dostępne próbki nie były wykrywalne w zakresie tych parametrów. Jednak obserwowane zmiany izotopowe skwalenu pochodzące z rekinów były w zakresie δ 13C: -19,9 do -20,9 ‰.

Przeciwnie, wartości $\delta^{13}\text{C}$ otrzymane dla skwalenu pochodzącego z oliwy z oliwek (*Olea Europaea*) są wyraźnie bardziej ujemne i wystarczająco różnią się od tych pochodzących od rekina, aby w pełni potwierdzić autentyczność pochodzenia.

Wartości $\delta^{13}\text{C}$ uzyskane (-27,8 do -28,4 ‰) są całkowicie w zakresie stosunku izotopowego dla obiegu fotosyntezy typu C3 lub Calvina (11). Dla porównania oceniano inne źródło roślinnego skwalenu:

Jaśmin (*Jasminum grandiflorum*), który zawiera od 4 do 8% skwalenu.

Średnia wartość $\delta^{13}\text{C}$ uzyskana wyniosła ok. -27 ‰. Mimo że jaśmin nie jest realnym źródłem skwalenu ze względu na cenę, wzajemne podobieństwo izotopowych wskaźników pozwala uzyskać potwierdzenie, że wszystkie roślinne źródła fotosyntezy typu C3 dają skwalen łatwo odróżnialny od materiału z rekinów poprzez określanie stosunków izotopowych.

W chwili obecnej, skwalen z roślin o innych możliwych cyklach fotosyntezy (C4 lub Hatch i CAM lub Osmond) są niedostępne lub nierentowne (np. skwalen z amarantusa, rodzaju C4 który ma wartość $\delta^{13}\text{C}$, ok. -15 ‰).

W celu potwierdzenia wykrycia ewentualnych mieszanin z dwóch podstawowych pochodzeń (rekin i oliwa), oceniano liniowość czynników odpowiedzi, w zależności od przygotowanych mieszanek w od 100% rekina do 100% z oliwek.

Próbki zostały przygotowane przez dodanie skwalenu rekina do skwalenu oliwy w znanych proporcjach od 100% skwalenu oliwy do 0% (czyli 100% skwalenu rekina).

Dla każdej próbki dubeltowe izotopowe określenie zostało przeprowadzone.

Średnie wyniki są podane w tabeli 2.

Pochodzenie Skwalenu	%Oliwy	%Rekina	wartości $\delta^{13}\text{C}$ ‰
Oliwa	100	0	-28,04
A	95	5	-27,57
B	90	10	-27,05
C	80	20	-26,25
D	70	30	-25,4
E	60	40	-24,39
F	50	50	-23,58
G	40	60	-22,84
H	30	70	-21,92
I	20	80	-20,93
J	10	90	-20,16
K	5	95	-19,85
Rekin	0	100	-19,29

Tabela 2 Wyniki średnie

Cząsteczka skwalenu jest przetwarzana w skwalan przez uwodornienie. Ważne jest, aby sprawdzić, czy rozkład izotopowy nie jest pod wpływem tej reakcji. Mieszanki skwalanu ze

współczynnikami jak poprzednio zostały przygotowane i zostały ustalone ich $\delta^{13}\text{C}$

Dla każdej próbki dubeltowe izotopowe określenie zostało przeprowadzone.

W oparciu o skład izotopowy delta $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ mierzony na próbkach czystego skwalanu (pochodzące z oliwa i od rekina), teoretyczną wartość dla każdej przygotowanej próbki obliczono w zależności od stężenia w każdej mieszance. Wyniki podane są w tabeli 3. Wyniki analiz izotopowych przygotowanych próbek ściśle odpowiadają obliczonej wartości.

W ten sposób było możliwe ustalenie wykresu wiążącego zawartości skwalen z oliwy w przygotowanych próbkach z ustalonymi wartościami delta $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (rys. 1).

Niepewność 0,30 ‰ przy ustalaniu wartości delta $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pozwala na ustalenie zawartości skwalanu z oliwy w granicach + / - 4%.

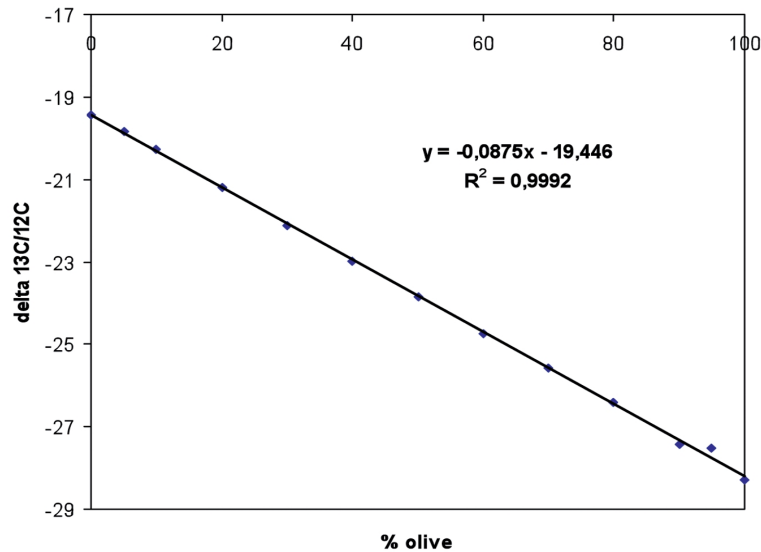
%Oliwy	%Rekina	wartości $\delta^{13}\text{C}$ ‰ skwalenu	wartości $\delta^{13}\text{C}$ ‰ skwalanu
100	0	-28.04	-28.28
95	5	-27.57	-27.53
90	10	-27.05	-27.44
80	20	-26.25	-26.40
70	30	-25.40	-25.58
60	40	-24.39	-24.73
50	50	-23.58	-23.86
40	60	-22.84	-22.97
30	70	-21.92	-22.11
20	80	-20.93	-21.21
10	90	-20.16	-20.29
5	95	-19.85	-19.86
0	100	-19.29	-19.43

Tabela 3 wartości teoretyczne

Wnioski

Wiedza na temat pochodzenia roślinnego i zwierzęcego skwalenu jest ważna nie tylko dla ochrony środowiska, ale również w zakresie jej stosowania w produktach naturalnych dla związanych zastosowań kosmetycznych i zdrowotnych. Oznaczanie stosunków izotopowych $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stanowi bardzo poważną technikę weryfikacji pochodzenia skwalenu i skwalanu. Wyraźna różnica w wartości izotopowej pomiędzy pochodzeniem roślinnym (oliwa) i zwierzęcym (rekin), związane z dokładnością techniki, pozwalają na precyzyjne określenie zawartości każdego pochodzenia partii pochodzących z mieszania.

Podziękowania Autorzy pragną podziękować Barnet Products Corp, Nikko Chemicals Co, CRM International, Laboratoire Monique Remy i Flavex Naturextrakte za dostarczenie oryginalnych składników.



Literatura:

- (1) Kawakami T., Takei N., Antoh M., Hasegawa H., Kise T., Eda S., A histopathological evaluation of the safety of Squalene fluid applied subcutaneously, *Medical science research*, 23 (1995) 8, 521- 523
- (2) Auffray, B., Protection against singlet oxygen, the main actor of sebum squalene peroxidation during sun exposure, using Commiphora myrrha essential oil. *International journal of cosmetic science*, 29 (2007) 1, 23-29
- (3) Adjuvant à base de Squalene dans les vaccins
Organisation mondiale de la sante. Relevé épidémiologique hebdomadaire, rapport du comité de l'OMS (2006)
- (4) Hayashi N., Togawa K., Yanagisawa M., Hosogi J., Mimura D., Yamamoto Y., Effect of sunlight exposure and ageing on skin surface lipids and urate. *Experimental Dermatology*, 12 (2003) Suppl 2:13-7
- (5) Remy M., Bayle J.C., Casabianca H., Graff J.B., Faugier V., Comparaison analytique de différentes productions de Jasmin grandiflorum L. Actes des 13 èmes journées internationales huiles essentielles Rivi. Ital. EPPOS, numero speciale gennaio 95 (1994) 46
- (6) He H.P., Corke H. Oil and squalene in Amaranthus grain and leaf, *J.Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 7913-7920
- (7) He H.P., Corke H., Cai J.G., Supercritical carbon dioxide extraction of oil and squalene from Amaranthus grain, *J.Agric. Food Chem.* 51 (2003), 7921-7925
- (8) Nishida T., Ninagawa Y., Itoi K., Fujita Y., New industrial synthesis of squalene. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* . 56(1983) 9, 2805-2810
- (9) Hatch M.D. and Slack C.R., Photosynthetic CO2 fixation pathways, *Ann. Rev. Plant. Physio.* (1966) 21
- (10) Hatch M.D. and Slack C.R., Photosynthesis by sugarcane leaves, *Bioch. J.*, 101 (1966) 103-111
- (11) Calvin M., The photosynthetic carbon cycle, *J.Chem.Soc.*, (1956) 1895-1915
- (12) Osmond C.B., Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context, *Ann.Rev.Plant Physio.* 29 (1978) 379-414
- (13) O'Leary M.H., Osmond C.B., Diffusional contribution to carbon isotope fractionation during dark CO2 fixation in CAM plants, *Plant Physio.* 66 (1980) 931-934
- (14) Aramendia M.,A., Marinas A., Marinas J.M., Moreno J.M., Moalem M., Rallo L. and Urbano F.J., Oxygen-18 measurement of Andalusian olive oils by continuous flow pyrolysis/ isotope ratio mass spectrometry. *Rap Com Mass Spectr* 21 (2007) 487-496
- (15) Spangenberg J. E., Ogrinc N., Authentication of vegetable oils by bulk and molecular carbon carbon isotope analyses with emphasis on olive oil and pumpkin seed oil. *J. Agric Food Chem* 49 (2001) 1534-1540
- (16) Royer A., Gerard C., Naulet N., Lees M. and Martin G.J., Stable isotope characterization of olive oils. 1 -compositional and carbon-13 profiles of fatty acid. *J. Amer oil chem soc.* 76 (1999) 3, 357-363
- (17) Angerosa F., Camera L., Cumitini S., Gleixner G., and Reniero F., Carbon stable isotopes and olive oil adulteration with Pomace oil. *J. Agric Food Chem* 45 (1997) 3044-3048.
- (18) Davenport S.R. and Bax N.J., A trophic study of a marine ecosystem off south-eastern Australia using stable isotopes of carbon and nitrogen. *Canad. J. Fish Aqu. Sci.* 59 (2002) 3, 514-530
- (19) Serrano R., Blanes M.A., Orero L., Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues from the western Mediterranean. 2007, *Chemos* 69 (2007) 1075-1080
- (20) Bell J.G., Preston T., Henderson R.J., Strachan F., Bron J.E., Cooper K., Morrison D., Discrimination of wild and cultural European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Using chemical and isotopic analyses. *J. Agric Food Chem* 55 (2007) 15, 5934-5941
- (21) P. Innegar J.K. and Polunin N.V.C., Differential fractionation of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ among fish tissues: implications for the study of Trophic interactions. *Func Ecol*, 13 (1999) 225-231

(22) Morrison D.J., Preston T., Bron J.E., Hemderson R.J., Cooper K., Strachan F., Bell J.G., Authenticating Production origin of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) by Chemical and Isotopic Fingerprinting, *Lipids* 42 (2007) 537-545

(23) Thomas F., Jamin E., Wietzerbin K., Guérin R., Lees M., Morvan E., Billault I., Derrien S., Rojas J.M.M., Serra F., Guillou C., Aursandl M., McEvoy L., Prael A. and Robins R.J., Determination of Origin of Atlantic Salmon (*Salmo salar*): the use of multiprobe and multielement isotopic Analyses in Combination with Fatty Acid Composition to assess Wild or farmed Origin, *J Agric Food Chem*, 56 (2008) 3, 989-997

* *Authors' address:*

P. Jame, H. Casabianca, M. Batteau,
P. Goetinck, V. Salomon
CNRS Service central d'analyse
Echangeur de Solaize
69360 Solaize
France
Email: p.jame@sca.cnrs.fr