

About detection of animal Squalene/Squalane in vegetable products used in the cosmetic field

Squalene and its hydrogenated product Squalane are highly sought raw materials by the cosmetic industries for their functional characteristics.

Besides a general preference by the cosmetic industry for ingredients of vegetable vs. animal origin, vegetable Squalene is most required since it is a co-product of vegetable oil production (or better, refining process), mainly olive oil (*Olea Europaea*), while animal Squalene is exclusively obtained by protected marine species (particularly little size sharks that live in deep water sea), and is therefore considered unethical by many users since sharks are slaughtered in (almost) totally illegal way (only for removing their liver while what remains of their body is thrown back into the sea!).

Especially during these last years we observed on the market Squalene/Squalane with very different prices: this may suggest a possible addition of animal origin product to the vegetable one.

Several years ago, analytical techniques were developed based on the determination of some minor compounds, such as sterols and neoformation hydrocarbons, that allowed to differentiate products of animal and vegetable origin.

However, innovative production technologies, together with continuous improvements of clean-up techniques, including the possible addition of vegetable unsaponifiables (especially obtained by deodorizer distillates from refining of corn and sunflower seed oil) made it very difficult to differentiate mixtures of animal and vegetable origin. In this work we revisited and updated this issue by using a combination of analytical techniques employed also in previous works by introducing preparative High Pressure Size Exclusion liquid Chromatography (HPSEC).

This new analytical procedure is structured as follows :

1. preventive screening by thin layer chromatography (TLC) in order to check the class of compounds, where detectable;
2. direct analysis by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) in order to highlight the presence of neoformation hydrocarbons and/or sterols, whereas the concentration at which these compounds were present would allow the detection;
3. separation by glass column chromatography in order to isolate and concentrate the fractions corresponding to neoformation hydrocarbons and/or the sterols, followed by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) analysis of the separated fractions;
4. where the separation of neoformation hydrocarbons from the matrix shows particular difficulties related to the extreme similarity of chromatographic major component (the case of Squalanes), liquid chromatography HPSEC is used for isolating and concentrating the fraction to be investigated;
5. separation by Silver nitrate of the fraction corresponding to the neoformation hydrocarbons, in order to eliminate possible interference of products with a number of double bonds higher than those found in the Steradienes.

The results show that the differentiation between animal and vegetable Squalene and its hydrogenated derivative Squalane can be made through the detection of markers of the animal (Cholesterol) and vegetable (Sitosterol) origins, of their dehydroxylated derivatives (Steradienes), and of their corresponding hydrogenated products (Stanols and Steranes).

A. Gasparoli¹
C. Mariani¹
M.E. Gaboardi¹
G. Morchio²
G. Santus^{3*}

¹ Divisione SSOG - Innovhub
Stazioni Sperimentali per
l'Industria - Azienda Speciale
della Camera di Commercio di
Milano

² Technoil C.S., Imperia

³ Amedeo Brasca & C. Srl,
Origgio (VA)

*CORRESPONDENCE TO:
e-mail: giacomo.santus@brasca.it

Sulla possibile individuazione di Squalene/Squalano animale nei corrispettivi prodotti vegetali utilizzati nel settore cosmetico

Lo Squalene e il suo derivato idrogenato Squalano sono materie prime molto ricercate dall'industria cosmetica per le loro caratteristiche funzionali.

Oltre ad una generale preferenza dell'industria cosmetica per ingredienti di origine vegetale anziché animale, lo Squalene vegetale è maggiormente richiesto in quanto è un coprodotto della lavorazione/raffinazione degli oli vegetali, prevalentemente dell'olio d'oliva (*Olea Europea*) mentre l'utilizzo dello Squalene animale, provenendo esclusivamente da specie ittiche protette (in particolare squali di piccole e medie dimensioni che vivono in acque profonde), è considerato non etico da molti utilizzatori, poiché la cattura avviene in modo totalmente illegale.

La presenza sul mercato, da alcuni anni, di Squalene/Squalano con quotazioni molto diverse, ha indotto ad ipotizzare una possibile aggiunta del prodotto di origine animale a quello di origine vegetale. Diversi anni orsono, sono state messe a punto tecniche analitiche basate sul dosaggio di alcuni componenti minori, quali gli steroli e gli idrocarburi di neoformazione, che hanno consentito di differenziare prodotti di origine animale da quelli di origine vegetale. Tuttavia, l'impiego di innovative tecnologie di produzione, insieme a continui miglioramenti delle tecniche di purificazione e la possibile aggiunta di insaponificabili vegetali ottenuti, in particolare, dalla lavorazione degli oli di semi di mais e girasole, hanno reso molto difficile la differenziazione di miscele e/o commistioni tra la provenienza animale e quella vegetale. In questo lavoro abbiamo riaffrontato la problematica attraverso tecniche analitiche coordinate, introducendo, accanto alle tecniche utilizzate anche nei precedenti lavori, la cromatografia liquida ad esclusione sterica preparativa.

L'iter analitico seguito si è così articolato:

1. screening preliminare mediante cromatografia su strato sottile, per verificare le classi di composti presenti, laddove rilevabili;
2. analisi diretta per gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), allo scopo di evidenziare la presenza di idrocarburi di neoformazione e/o di steroli, laddove la concentrazione alla quale questi composti erano presenti ne consentisse la rilevazione;
3. separazione mediante cromatografia su colonna, per isolare e concentrare le frazioni corrispondenti agli idrocarburi di neoformazione e/o agli steroli, sottoponendo successivamente le frazioni separate ad analisi mediante gascromatografia-spettrometria di massa;
4. laddove la separazione degli idrocarburi di neoformazione dalla matrice presentasse difficoltà particolari, legate all'estrema similarità cromatografica del componente principale (caso degli Squalani), utilizzo della cromatografia liquida HPSEC per isolare e concentrare la frazione da indagare;
5. separazione mediante Argento Nitrate della frazione corrispondente agli idrocarburi di neoformazione, allo scopo di eliminare eventuali interferenze di composti aventi numero di doppi legami superiore a quelli presenti negli steradieni.

Dai risultati ottenuti emerge che la differenziazione tra origine animale e vegetale dello Squalene e del suo derivato idrogenato Squalano, può essere effettuata attraverso la ricerca dei marker di origine animale (Colesterolo) e del mondo vegetale (Sitosterolo) e dei loro derivati deidrossilati, gli steradieni, nonché dei loro corrispondenti prodotti idrogenati, gli stanoli e gli sterani.