

## A Milk Quality Index

### Rapid Quantitative Determination of Indole Hormone Melatonin.

Updated on 18 December 2024

*Fernando Tateo (\*\*\*)*, *Monica Bononi (\*\*\*)*, *Piercristiano Brazzale (\*\*)*,

*Elena Cumerlato (\*)*, *Karen Rossi (\*)*

(\*\*\*) *UniMi - BSC Brazzale S.p.A.*

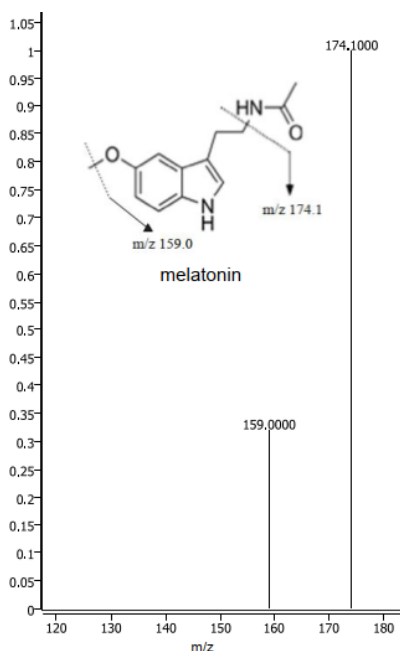
(\*\*) *BSC - Brazzale S.p.A*

(\*) *BSC*

### Abstract

Melatonin (5-methoxy-acetyltryptamine) is an indole hormone produced in the pineal gland of brain, is a tryptophan derivative and an antioxidant which contributes to the development of brain. The hormone is supplied through mother milk or cow milk.

Studies have shown that exogenous melatonin is useful on the treatment of Alzheimer disease,



Parkinson disease, glaucoma, depressive disorders.

As a component of limited content, this hormone can be considered as an index of milk quality, being sensitive to inadequate heat treatments, storage in suboptimal conditions, and unsuitable health conditions of the producer animal.

Paredes et al. (2005) in *Appl.Biomed.*3:47-57 has linked low plasma levels of melatonin to acute stress (physical activity).

A rapid and reliable method by LC/MS/MS for the determination of melatonin in milk, was developed by F.Tateo et al. in Brazzale Science Center, Cogollo (VI).

Some data concerning the melatonin in milk samples of Vicenza market are reported.

## Riassunto

La Melatonina (5-methoxy-acetyltryptamina) è un ormone indolico prodotto dalla ghiandola pineale del cervello, ed è un antiossidante che contribuisce allo sviluppo della massa cerebrale. Questo ormone viene a ritrovarsi nel latte di donna o nel latte di mucca.

Gli studi condotti hanno dimostrato che la melatonina di origine esogena è utile nel trattamento dei disturbi dell'Alzheimer, dei disturbi del Parkinson, nel glaucoma, e nei disturbi causati da depressione.

Essendo un componente presente in contenuto molto limitato, la melatonina può essere considerata come un indice di qualità del latte, perché sensibile ai trattamenti termici, di stoccaggio in condizioni non ottimali ed in condizioni di salute non adeguate dell'animale produttore.

Un metodo semplice e rapido per la determinazione della melatonina nel latte per LC/MS/MS è stato realizzato nel centro di ricerche BSC di Brazzale SpA, Cogollo (VI).

## Preparazione del campione per l'analisi LC/MS/MS (Metodo BSC)

Prelevare 10 mL di latte e porli in un contenitore Falcon da 50 mL con fondo conico.

Addizionare 600  $\mu$ L di acido acetico e miscelare con vortex. Addizionare in provetta 30 g di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e mescolare con spatola di metallo per disperdere uniformemente il sale. Addizionare 2 mL di metanolo e agitare in vortex per 20 min.

Lasciare a riposo 1h per facilitare la separazione del surnatante. Prelevare il surnatante con pipetta Pasteur (non è necessario recuperare tutto il volume di metanolo usato per spostare l'analita nella fase organica) e filtrare su Millipore 0,45  $\mu$ m.

Si trasferisce il filtrato in vial per campionatore di LC/MS/MS e si iniettano 5 $\mu$ L in colonna Agilent Infinity Lab Poroshell 120 per HPLC (EC-C18, 21x50 mm, x1,9  $\mu$ m).

Flusso in colonna: 0,2 mL/min

Fase mobile: (A) H<sub>2</sub>O /CH<sub>3</sub>COOH 20% (p/p) , (B) MeOH

Progr: gradiente da 0 a 30 min fase B da 10% a 100%, isocratica fase B 100% per 10 min, gradiente da 40 min a 50 min fase B da 100 % a 10%.

Sorgente: ESI + AJS; T: 250°C; sheath gas flow: 11 L/min

Nebulizzatore: 35 psi

Capillarità: Positiva 4000 V

Ione 233 → 174.1, Dwell time 300, Frag. 84, E Coll. 10 Volt.

## **Sulla determinazione della melatonina in alcuni campioni di latte distribuiti nel territorio vicentino**

Un primo approccio alla valorizzazione della qualità del latte attraverso la conferma del contenuto di melatonina essere in concentrazione adeguata alla natura di latte di qualità, è stato svolto nei laboratori BSC di Cogollo con metodica derivata da ricerche atte a semplificare la metodica di determinazione e con l'impiego di tecnica LC/MS/MS. L'applicazione, di cui in questa nota F.Tateo e coll. espongono i primi risultati riferiti ad alcuni campioni reperiti sul mercato locale, sarà estesa a più campioni rappresentativi della qualità di altre produzioni nazionali ed i risultati saranno oggetto di successive note sperimentali.

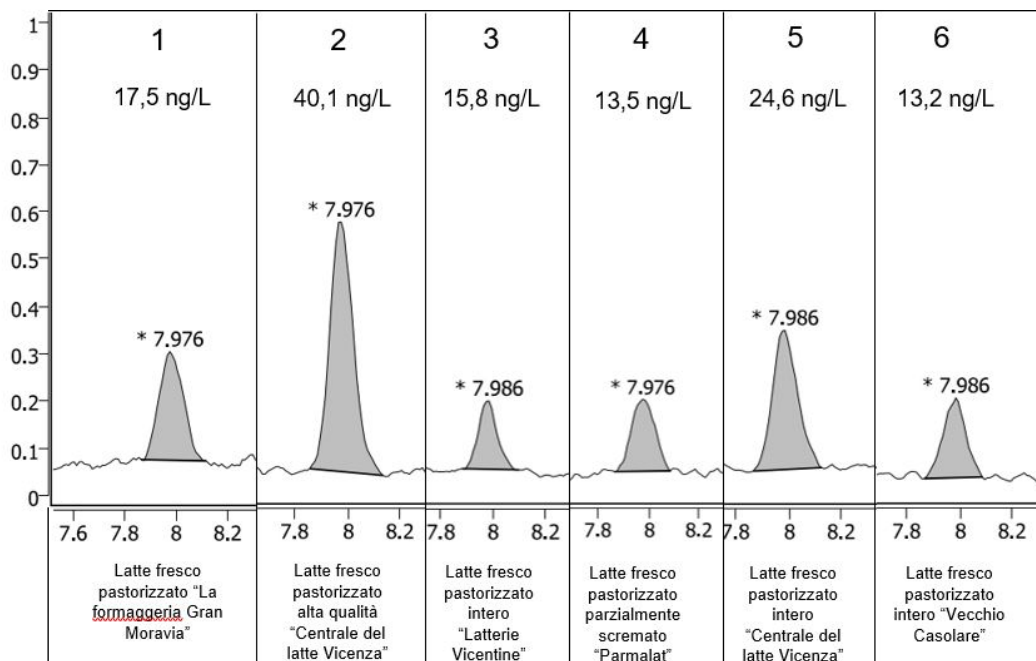
I campioni del commercio presi in esame in questa prima fase della ricerca sono così identificati:

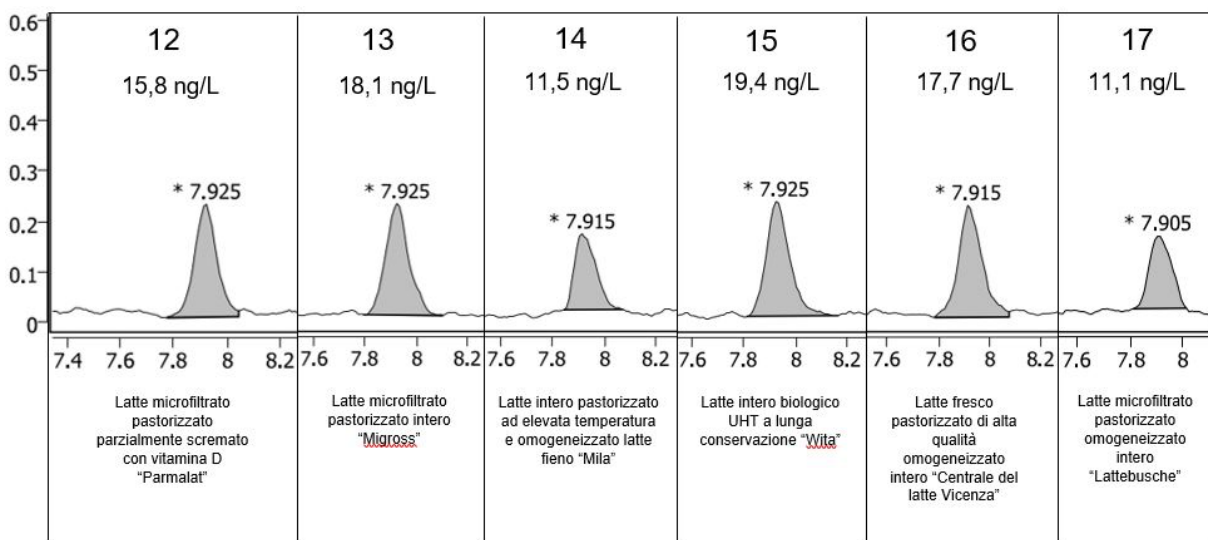
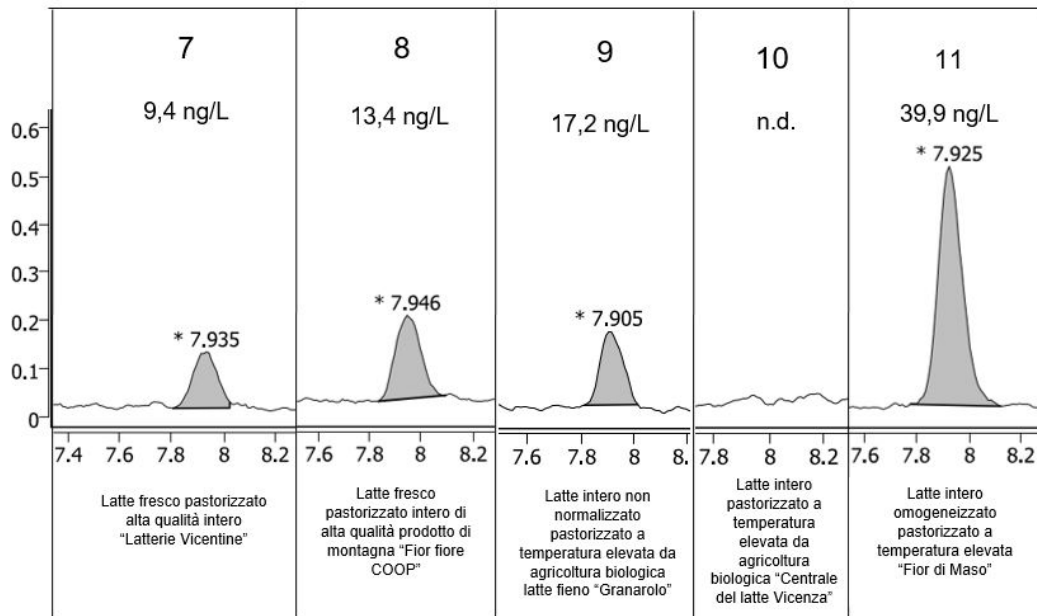
- 1) Latte fresco pastorizzato ad alta temperatura omogeneizzato (1 L)  
"La Formaggeria". Scad.16/09/2024. Campione acquistato a Zanè (VI).
- 2) Latte fresco pastorizzato di alta qualità omogeneizzato intero (1 L)  
"Centrale del latte Vicenza". Scad.16/09/2024. Campione acquistato a Zanè (VI).
- 3) Latte fresco pastorizzato alta qualità intero (0,5 L)  
"Latterie Vicentine". Scad.16/09/2024. Campione acquistato a Zanè (VI).
- 4) Latte fresco parzialmente scremato pastorizzato (1 L)  
"Parmalat". Scad.15/09/2024. Campione acquistato a Zanè (VI).
- 5) Latte intero omogeneizzato pastorizzato a temperatura elevata (0,5 L)  
"Centrale di Vicenza". Scad. 26/09/2024. Campione acquistato a Zanè (VI).
- 6) Latte fresco intero pastorizzato (1 L)  
"Vecchio Casolare" Scad. 13/09/2024. Campione acquistato a Zanè (VI).
- 7) Latte fresco intero pastorizzato alta qualità (0,5 L)  
"Latterie Vicentine". Scad. 11/11/2024. Campione acquistato a Schio (VI).
- 8) Latte fresco intero pastorizzato alta qualità, prodotto di montagna (1 L)  
"Fior Fiore Coop". Scad. 11/11/2024. Campione acquistato a Schio (VI).
- 9) Latte intero pastorizzato a temperatura elevata, da agricoltura biologica (1 L)  
"Granarolo". Scad . 30/11/2024. Campione acquistato a Piovene Rocchette (VI).
- 10) Latte intero pastorizzato a temperatura elevata, da agricoltura biologica (1 L)  
"Centrale del latte Vicenza". Scad. 25/10/2024. Campione acquistato a Piovene Rocchette (VI).

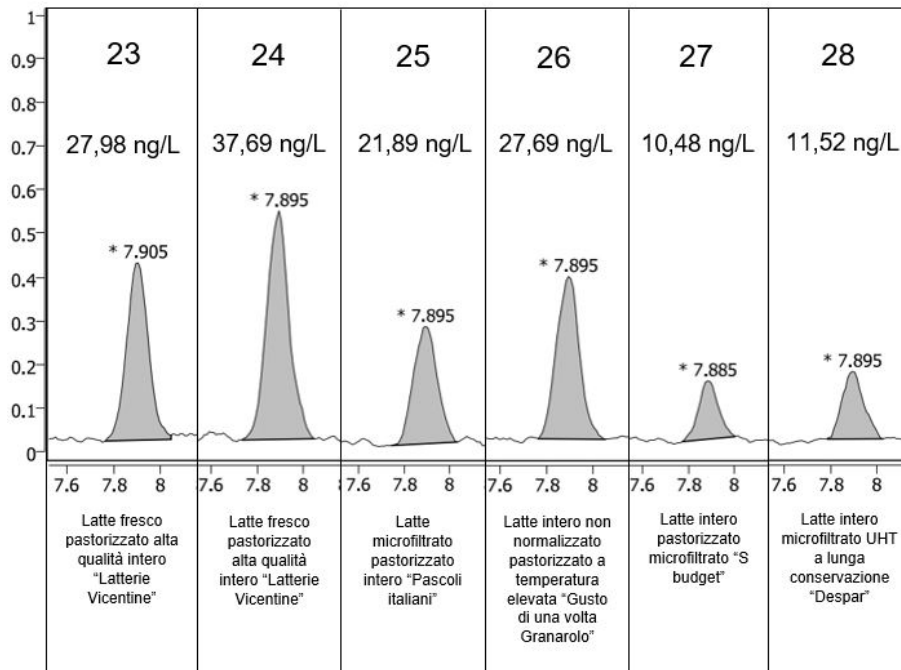
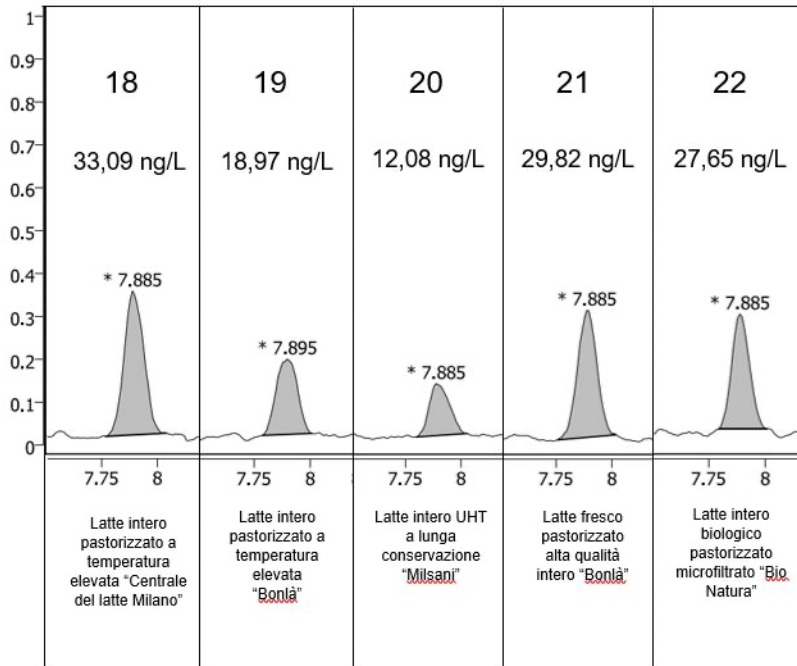
- 11) Latte intero omogeneizzato pastorizzato a temperatura elevata (1 L)  
“Fior di Maso”. Scad. 30/10/2024. Campione acquistato a Piovene Rocchette (VI).
- 12) Latte microfiltrato pastorizzato parzialmente scremato con vitamina D (1 L)  
“Parmalat”. Scad. 31/10/2024. Campione acquistato ad Asiago (VI).
- 13) Latte microfiltrato pastorizzato intero (1 L)  
“Migross”. Scad. 03/11/2024. Campione acquistato ad Asiago (VI).
- 14) Latte intero pastorizzato ad elevata temperatura e omogeneizzato (1 L)  
“Mila”. Scad. 09/11/2024. Campione acquistato ad Asiago (VI).
- 15) Latte intero biologico UHT a lunga conservazione (1 L)  
“Wita”. Scad. 01/01/2025. Campione acquistato ad Asiago (VI).
- 16) Latte fresco pastorizzato di alta qualità omogeneizzato intero (1 L)  
“Centrale del latte Vicenza”. Scad. 04/11/2024. Campione acquistato a Schio (VI).
- 17) Latte microfiltrato pastorizzato omogeneizzato intero (1 L)  
“Lattebusche”. Scad. 14/11/2024. Campione acquistato a Schio (VI).
- 18) Latte intero pastorizzato a temperatura elevata (0,5 L)  
“Centrale del latte Milano”. Scad. 27/11/2024. Campione acquistato a Milano (MI).
- 19) Latte intero pastorizzato a temperatura elevata (1 L)  
“Bonlà”. Scad. 29/11/2024. Campione acquistato a Lendinara (RO).
- 20) Latte intero UHT a lunga conservazione (1 L)  
“Milsani”. Scad. 30/04/2025. Campione acquistato a Lendinara (RO).
- 21) Latte fresco pastorizzato alta qualità intero (1 L)  
“Bonlà”. Scad. 29/11/2024. Campione acquistato a Lendinara (RO).
- 22) Latte intero biologico pastorizzato microfiltrato (1 L)  
“Bio natura”. Scad. 02/12/2024. Campione acquistato a Lendinara (RO).
- 23) Latte fresco pastorizzato alta qualità intero (1 L)  
“Latterie Vicentine”. Scad. 10/12/2024. Campione acquistato a Zanè (VI).
- 24) Latte fresco pastorizzato alta qualità intero (1 L)  
“Latterie Vicentine”. Scad. 12/12/2024. Campione acquistato a Schio (VI).
- 25) Latte microfiltrato pastorizzato intero (1 L)  
“Pascoli italiani”. Scad. 21/12/2024. Campione acquistato a Schio (VI).

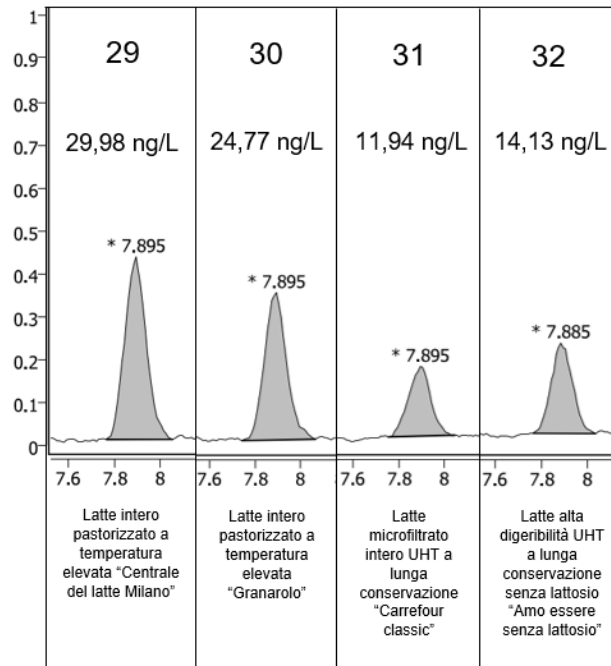
- 26) Latte intero non normalizzato pastorizzato a temperatura elevata (1 L)  
“Gusto di una volta Granarolo”. Scad. 22/12/2024. Campione acquistato a Schio (VI).
- 27) Latte intero pastorizzato microfiltrato (1 L)  
“S budget”. Scad. 23/12/2024. Campione acquistato a Schio (VI).
- 28) Latte intero microfiltrato UHT a lunga conservazione (0,5 L)  
“Despar”. Scad. 16/03/2025. Campione acquistato a Schio (VI).
- 29) Latte intero pastorizzato a temperatura elevata (0,5L)  
“Centrale del latte Milano”. Scad. 08/12/2024. Campione acquistato a Milano (MI).
- 30) Latte intero pastorizzato a temperatura elevata (1 L)  
“Granarolo”. Scad. 19/12/2024. Campione acquistato a Milano (MI).
- 31) Latte microfiltrato intero UHT a lunga conservazione (0,5 L)  
“Carrefour classic”. Scad. 28/02/2025. Campione acquistato a Milano (MI).
- 32) Latte alta digeribilità UHT a lunga conservazione senza lattosio (0,2 L)  
“Amo essere senza lattosio”. Scad. 18/02/2025. Campione acquistato a Schio (VI).

I dati risultanti sono contenuti in un intervallo compreso fra 0,0 ng/L e 40,1 ng/L









Nella pagina 9 si riporta lo schema di calcolo del valore di RSDr ottenuto adottando il sistema NMKL 5th Ed.

Nella pagina 12 si riferisce sul valore di melatonina riscontrato in formaggio Gran Moravia di Brazzale SpA (matricola CG, Febbraio 2024).



ng/L						
1°inj	2°inj	media	(1°inj-2°inj)/media	[(1°inj-2°inj)/media] <sup>2</sup>	RSDr	U
13,02	18,60	15,81	-0,3529	0,124567	0,1112(*)	3,51
16,76	18,14	17,45	-0,0791	0,006254		3,88
15,34	13,22	14,28	0,1485	0,022040		3,17
14,92	11,88	13,40	0,2269	0,051468		2,98
24,26	24,84	24,55	-0,0236	0,000558		5,46
41,82	38,38	40,10	0,0858	0,007359		8,92
9,48	9,46	9,47	0,0021	0,000004		2,11
14,50	12,16	13,33	0,1755	0,030816		2,96
16,68	17,78	17,23	-0,0638	0,004076		3,83
0,00	0,00	0,00	0,0000	0,000000		0,00
<b>Σ</b>				<b>0,247143</b>		

$$RSDr = \sqrt{\frac{\sum \left[ \frac{1' inj - 2' inj}{media} \right]^2}{2n}} = \sqrt{\frac{0,247143}{20}} = 0,1112(*)$$

	[ ] ng/L melatonina	M	SD	RSD
1°inj	19,86	22,35	1,32	0,0591 (**)
2°inj	23,34			
3°inj	23,12			
4°inj	21,04			
5°inj	21,46			
6°inj	23,28			
7°inj	22,16			
8°inj	21,68			
9°inj	23,60			
10°inj	23,94			

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} = \frac{1,32}{22,35} = 0,0591 (**)$$

### Immagini dei campioni analizzati



**campioni 1 – 6**



**campioni 7 – 11**



**campioni 12 – 17**

**Brazzale** S.p.A.

Sede legale ed amministrativa: Via Pasubio, 2 - 36010 ZANE' (VI) - Italia  
Tel. +39 0445 313900 e-mail: [info@brazzale.com](mailto:info@brazzale.com)  
Partita IVA, Codice Fiscale e Registro Imprese di Vicenza n. 00160480240  
R.E.A. 111881/Vicenza - Capitale Sociale € 3.900.000,00 interamente versato  
Società soggetta alla direzione e coordinamento di Florentis S.r.l. - Thiene (VI) - Italia

**Brazzale** SCIENCE CENTER

Via Pasubio, 2 - 36010 ZANE' (VI) - Italia  
e-mail: [brazzalesc@brazzale.com](mailto:brazzalesc@brazzale.com)  
sito: [www.brazzalesc.com](http://www.brazzalesc.com)  
Laboratori di Ricerche Analitiche "Dr. Tino Brazzale"  
Via Sant'Antonio, 2 - 36010 Cogollo del Cengio (VI) - Italia





Campioni 18 – 22



Campioni 23 – 28



Campioni 29 – 32

**Brazzale** S.p.A.

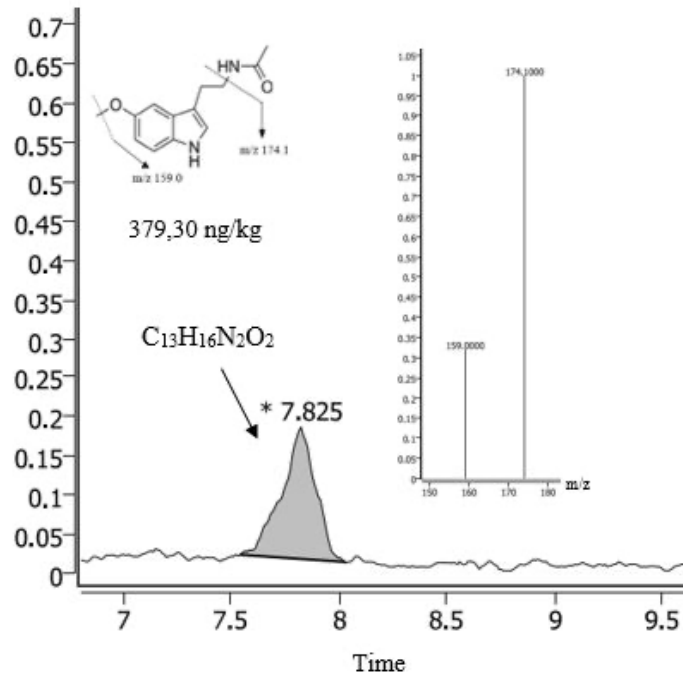
Sede legale ed amministrativa: Via Pasubio, 2 - 36010 ZANE' (VI) - Italia  
Tel. +39 0445 313900 e-mail: [info@brazzale.com](mailto:info@brazzale.com)  
Partita IVA, Codice Fiscale e Registro Imprese di Vicenza n. 00160480240  
R.E.A. 111881/Vicenza - Capitale Sociale € 3.900.000,00 interamente versato  
Società soggetta alla direzione e coordinamento di Florentis S.r.l. - Thiene (VI) - Italia

**Brazzale** SCIENCE CENTER

Via Pasubio, 2 - 36010 ZANE' (VI) - Italia  
e-mail: [brazzalesc@brazzale.com](mailto:brazzalesc@brazzale.com)  
sito: [www.brazzalesc.com](http://www.brazzalesc.com)  
Laboratori di Ricerche Analitiche "Dr. Tino Brazzale"  
Via Sant'Antonio, 2 - 36010 Cogollo del Cengio (VI) - Italia



### Verifica analitica del contenuto di melatonina in “Gran Moravia”



La bibliografia non riporta dati sul contenuto di melatonina in formaggi ed altri derivati del latte: con il metodo semplificato per LC/MS/MS e adottato per l'analisi dei campioni di latte di cui sopra, un campione maturato per tredici mesi di Gran Moravia (lotto RB) è risultato contenere 379,30 ng/Kg di melatonina: il risultato è confermato per identificazione LC/MS/MS dei due ioni “figli” m/z

159 e 174.1 derivati da m/z 233. Il metodo analitico deriva da quello adottato per il latte, con opportune modifiche adottate per l'adeguamento a matrici solide.

Cogollo del Cengio, 18 dicembre 2024

**Laboratori di Ricerche Analitiche “Dr. Tino Brazzale”**

**Brazzale** S.p.A.

Sede legale ed amministrativa: Via Pasubio, 2 - 36010 ZANE' (VI) - Italia  
Tel. +39 0445 313900 e-mail: [info@brazzale.com](mailto:info@brazzale.com)  
Partita IVA, Codice Fiscale e Registro Imprese di Vicenza n. 00160480240  
R.E.A. 111881/Vicenza - Capitale Sociale € 3.900.000,00 interamente versato  
Società soggetta alla direzione e coordinamento di Florentis S.r.l. - Thiene (VI) - Italia

**Brazzale** SCIENCE CENTER

Via Pasubio, 2 - 36010 ZANE' (VI) - Italia  
e-mail: [brazzalesc@brazzale.com](mailto:brazzalesc@brazzale.com)  
sito: [www.brazzalesc.com](http://www.brazzalesc.com)  
Laboratori di Ricerche Analitiche “Dr. Tino Brazzale”  
Via Sant'Antonio, 2 - 36010 Cogollo del Cengio (VI) - Italia

