

A Milk Quality Index

Rapid Quantitative Determination of Indole Hormone Melatonin.

Updated on 04 April 2025

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

Elena Cumerlato (*), Karen Rossi (*)

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

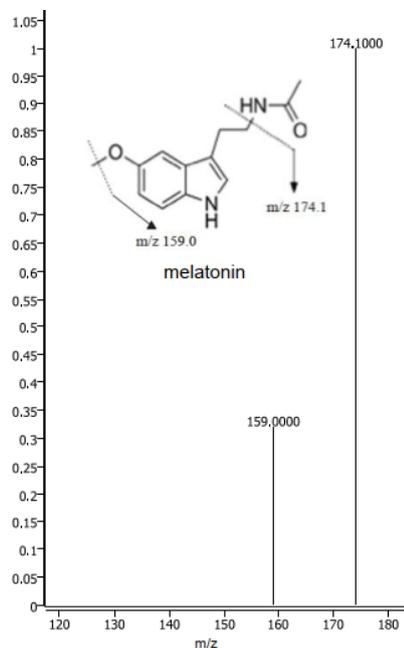
(**) BSC - Brazzale S.p.A

(*) 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.

Aggiungere 600 µL di acido acetico e miscelare con vortex. Aggiungere in provetta 30 g di Na₂SO₄ anidro e mescolare con spatola di metallo per disperdere uniformemente il sale. Aggiungere 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 µm.

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

Flusso in colonna: 0,2 mL/min

Fase mobile: (A) H₂O /CH₃COOH 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 campioni di latte distribuiti nel territorio Vicentino

Un primo studio sulla possibilità di considerare un altro dato non convenzionale per la valorizzazione della qualità del latte è stato svolto nei laboratori BSC di Cogollo attraverso la determinazione di un componente secondario, quale la melatonina. La metodica adottata è derivata da ricerche atte a semplificare le metodiche di determinazione fino ad oggi in atto e con l'impiego di tecnica LC/MS/MS. L'applicazione, di cui in questa nota F.Tateo e coll. espongono i risultati si riferiscono a campioni reperiti sul mercato locale, preferibilmente nella provincia di Vicenza, ma alcune determinazioni si riferiscono a più campioni rappresentativi della qualità di altre produzioni nazionali ed i risultati sono oggetto di unica valutazione e riportati in questa nota.

I campioni di latte del commercio presi in esame in questa prima fase della ricerca sono i seguenti, e i risultati sono compresi nell'intervallo [n.d. - 82,1 ng/L]: (vedi pag. 3-7)

Tabella 1. Elenco dei campioni di latte del territorio Vicentino di cui è stato determinato il contenuto in melatonina.

	descrizione	marchio	scadenza	comune di acquisto	melatonina ng/L
1)	latte fresco pastorizzato ad alta temperatura omogeneizzato (1L)	La Formaggeria	16/09/2024	Zanè (Vi)	17,5
2)	latte fresco pastorizzato di alta qualità omogeneizzato intero (1L)	Centrale del latte Vicenza	16/09/2024	Zanè (Vi)	40,1
3)	latte fresco pastorizzato alta qualità intero (0,5L)	Latterie Vicentine	16/09/2024	Zanè (Vi)	15,8
4)	latte fresco parzialmente scremato pastorizzato (1L)	Parmalat	15/09/2024	Zanè (Vi)	13,5
5)	latte intero omogeneizzato pastorizzato a temperatura elevata (0,5L)	Centrale del latte Vicenza	26/09/2024	Zanè (Vi)	24,6
6)	latte fresco intero pastorizzato (1L)	Vecchio Casolare	13/09/2024	Zanè (Vi)	13,2
7)	latte fresco intero pastorizzato alta qualità (0,5L)	Latterie Vicentine	11/11/2024	Schio (Vi)	9,4

	descrizione	marchio	scadenza	comune di acquisto	melatonina ng/L
8)	latte fresco intero pastorizzato alta qualità, prodotto di montagna (1L)	Fior fiore Coop	11/11/2024	Schio (Vi)	13,4
9)	latte intero pastorizzato a temperatura elevata, da agricoltura biologica (1L)	Granarolo	30/11/2024	Piovene Rocchette (Vi)	17,2
10)	latte intero pastorizzato a temperatura elevata, da agricoltura biologica (1L)	Centrale del latte Vicenza	25/10/2024	Piovene Rocchette (Vi)	n.d.
11)	latte intero omogeneizzato pastorizzato a temperatura elevata (1L)	Fior di Maso	30/10/2024	Piovene Rocchette (Vi)	39,9
12)	latte microfiltrato pastorizzato parzialmente scremato con vitamina D (1L)	Parmalat	31/10/2024	Asiago (Vi)	15,8
13)	latte microfiltrato pastorizzato intero (1L)	Migross	03/11/2024	Asiago (Vi)	18,1
14)	latte intero pastorizzato ad elevata temperatura e omogeneizzato (1L)	Mila	09/11/2024	Asiago (Vi)	11,5
15)	latte intero biologico UHT a lunga conservazione (1L)	Wita	01/01/2025	Asiago (Vi)	19,4
16)	latte fresco pastorizzato di alta qualità omogeneizzato intero (1L)	Centrale del latte Vicenza	04/11/2024	Schio (Vi)	17,7
17)	latte microfiltrato pastorizzato omogeneizzato intero (1L)	Lattebusche	14/11/2024	Schio (Vi)	11,1
18)	latte intero pastorizzato a temperatura elevata (0,5L)	Centrale del latte Milano	27/11/2024	Milano (Mi)	33,1
19)	latte intero pastorizzato a temperatura elevata (1L)	Bonlà	29/11/2024	Lendinara (Ro)	19,0
20)	latte intero UHT a lunga conservazione (1L)	Milsani	30/04/2025	Lendinara (Ro)	12,1
21)	latte fresco pastorizzato alta qualità intero (1L)	Bonlà	29/11/2024	Lendinara (Ro)	29,8
22)	latte intero biologico pastorizzato microfiltrato (1L)	Bio natura	02/12/2024	Lendinara (Ro)	27,7

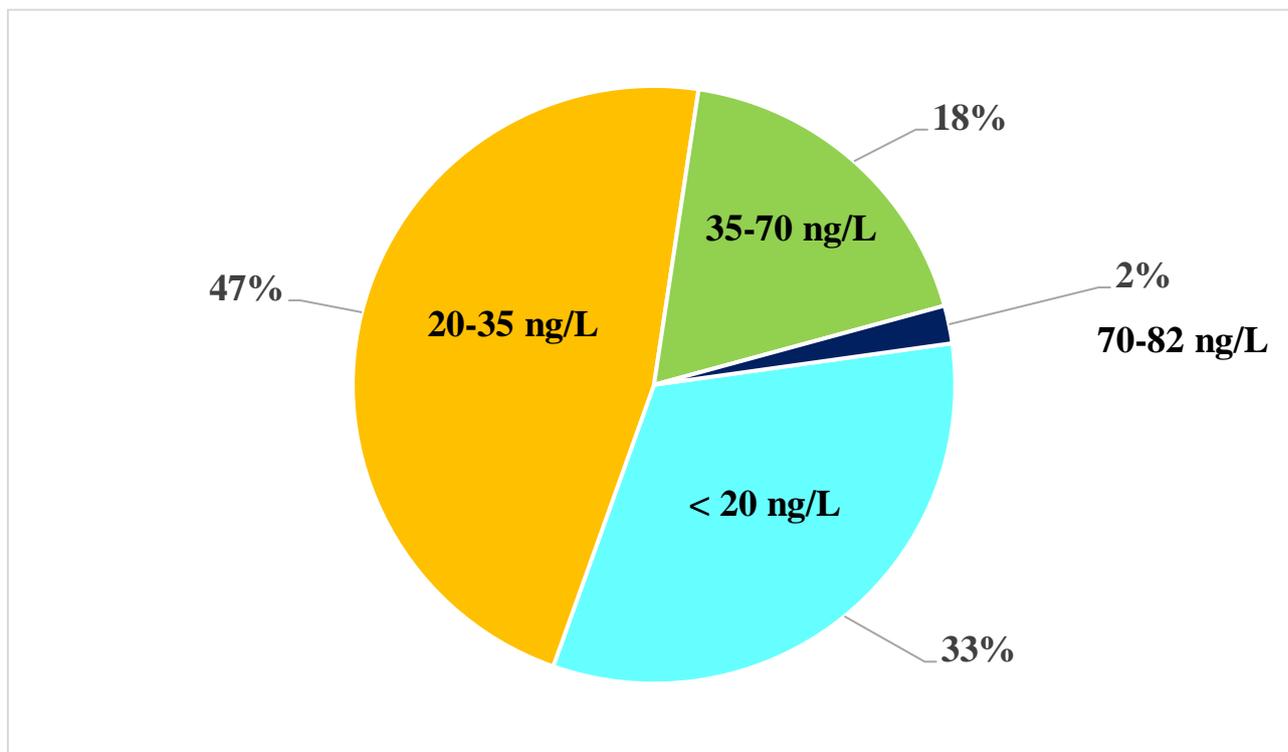
	descrizione	marchio	scadenza	comune di acquisto	melatonina ng/L
23)	latte fresco pastorizzato alta qualità intero (1L)	Latterie Vicentine	10/12/2024	Zanè (Vi)	28,0
24)	latte fresco pastorizzato alta qualità intero (1L)	Latterie Vicentine	12/12/2024	Schio (Vi)	37,7
25)	latte microfiltrato pastorizzato intero (1L)	Pascoli italiani	21/12/2024	Schio (Vi)	21,9
26)	latte intero non normalizzato pastorizzato a temperatura elevata (1L)	Gusto di una volta Granarolo	22/12/2024	Schio (Vi)	27,7
27)	latte intero pastorizzato microfiltrato (1L)	S budget	23/12/2024	Schio (Vi)	10,5
28)	latte intero microfiltrato UHT a lunga conservazione (0,5L)	Despar	16/03/2025	Schio (Vi)	11,5
29)	latte intero pastorizzato a temperatura elevata (0,5L)	Centrale del latte Milano	08/12/2024	Milano (Mi)	30,0
30)	latte intero pastorizzato a temperatura elevata (1L)	Granarolo	19/12/2024	Milano (Mi)	24,8
31)	latte microfiltrato intero UHT a lunga conservazione (0,5L)	Carrefour classic	28/02/2025	Milano (Mi)	11,9
32)	latte alta digeribilità UHT a lunga conservazione senza lattosio (0,2L)	Amo essere senza lattosio	18/02/2025	Schio (Vi)	14,1
33)	latte intero UHT a lunga conservazione (0,5L)	Venezia	21/03/2025	Schio (Vi)	42,0
34)	latte intero fresco pastorizzato di alta qualità (1L)	Latteria Soligo	10/01/2025	Caorle (Ve)	45,9
35)	latte fresco pastorizzato omogeneizzato di alta qualità di montagna (1L)	Lattebusche	10/01/2025	Caorle (Ve)	82,1
36)	latte intero pastorizzato microfiltrato (1L)	Vale	15/01/2025	Caorle (Ve)	26,9
37)	latte intero pastorizzato a temperatura elevata (0,5L)	Latteria Soligo	20/01/2025	Caorle (Ve)	52,5

	descrizione	marchio	scadenza	comune di acquisto	melatonina ng/L
38)	latte fieno parzialmente scremato UHT a lunga conservazione omogeneizzato (1L)	Alpenspitz	26/01/2025	Schio (Vi)	18,9
39)	latte intero pastorizzato a temperatura elevata da agricoltura biologica (1L)	Granarolo	29/01/2025	Piovene Rocchette (Vi)	29,7
40)	latte intero non normalizzato pastorizzato a temperatura elevata (1L)	Gusto di una volta	08/02/2025	Piovene Rocchette (Vi)	23,8
41)	latte intero omogeneizzato pastorizzato a temperatura elevata (1L)	Fior di Maso	19/02/2025	Piovene Rocchette (Vi)	38,3
42)	latte intero pastorizzato a temperatura elevata da agricoltura biologica (1L)	Centrale del latte Vicenza	07/02/2025	Thiene (Vi)	23,6
43)	latte pastorizzato a temperatura elevata senza lattosio (0,5L)	Zymil	10/02/2025	Thiene (Vi)	27,6
44)	latte intero UHT a lunga conservazione (0,5L)	Centrale del latte Milano	05/03/2025	Thiene (Vi)	45,0
45)	latte intero microfiltrato UHT a lunga conservazione (0,5L)	Sterilgarda	03/04/2025	Thiene (Vi)	21,6
46)	latte fresco pastorizzato (1L)	Latte Pennar	12/02/2025	Asiago (Vi)	34,9
47)	latte intero omogeneizzato UHT a lunga conservazione (0,5L)	Centrale del latte Vicenza	30/05/2025	Piovene Rocchette (Vi)	36,6
48)	latte parzialmente scremato omogeneizzato UHT a lunga conservazione (0,5L)	Centrale del latte Vicenza	14/06/2025	Piovene Rocchette (Vi)	34,5
49)	latte UHT scremato omogeneizzato a lunga conservazione (0,5L)	Centrale del latte Vicenza	26/04/2025	Piovene Rocchette (Vi)	34,8
50)	latte intero microfiltrato UHT a lunga conservazione (0,5L)	Despar	05/06/2025	Verona (Vr)	45,4
51)	latte parzialmente scremato microfiltrato UHT a lunga conservazione (0,5L)	Despar	21/05/2025	Verona (Vr)	34,3

	descrizione	marchio	scadenza	comune di acquisto	melatonina ng/L
52)	latte scremato microfiltrato UHT a lunga conservazione (0,5L)	Despar	06/06/2025	Verona (Vr)	34,6
53)	latte intero UHT a lunga conservazione (0,5L)	Mila	14/04/2025	Verona (Vr)	25,4
54)	latte parzialmente scremato UHT a lunga conservazione (0,5L)	Mila	05/05/2025	Verona (Vr)	22,8
55)	latte scremato UHT a lunga conservazione (0,5L)	Mila	27/04/2025	Verona (Vr)	23,3
56)	latte intero UHT a lunga conservazione (1L)	Bayernland	06/05/2025	Schio (Vi)	34,3

Nel grafico che segue è stata valutata la distribuzione percentuale del contenuto di melatonina nei campioni di latte di cui alla tabella precedente (di pag.3-7).

Grafico 1. Distribuzione percentuale del contenuto di melatonina nei campioni di latte analizzati



Valutazioni statistiche sul metodo

I dati che seguono dimostrano la buona significatività dei risultati analitici attraverso il calcolo dei valori di RSD e di RSDr ottenuti adottando il sistema NMKL 5th Ed. I valori dei due indici sono riportati in seguito insieme a tutti i singoli valori ottenuti in sperimentazione.

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

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

	melatonina (ng/L)	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 56 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
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
sito: 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



Campioni 33 – 37



Campioni 38 – 42



Campioni 43 – 46

Brazzale S.p.A.

Sede legale ed amministrativa: Via Pasubio, 2 - 36010 ZANE' (VI) - Italia
Tel. +39 0445 313900 e-mail: 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
sito: www.brazzalesc.com
Laboratori di Ricerche Analitiche "Dr. Tino Brazzale"
Via Sant'Antonio, 2 – 36010 Cogollo del Cengio (VI) - Italia





Campioni 47 – 51



Campioni 52 – 56

Brazzale S.p.A.

Sede legale ed amministrativa: Via Pasubio, 2 - 36010 ZANE' (VI) - Italia
Tel. +39 0445 313900 e-mail: 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
sito: www.brazzalesc.com
Laboratori di Ricerche Analitiche "Dr. Tino Brazzale"
Via Sant'Antonio, 2 – 36010 Cogollo del Cengio (VI) - Italia

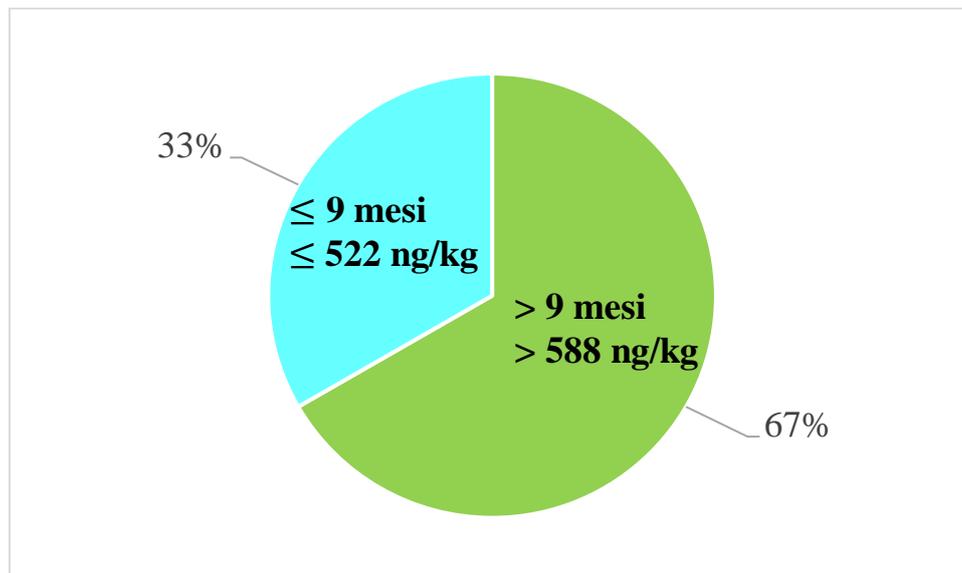


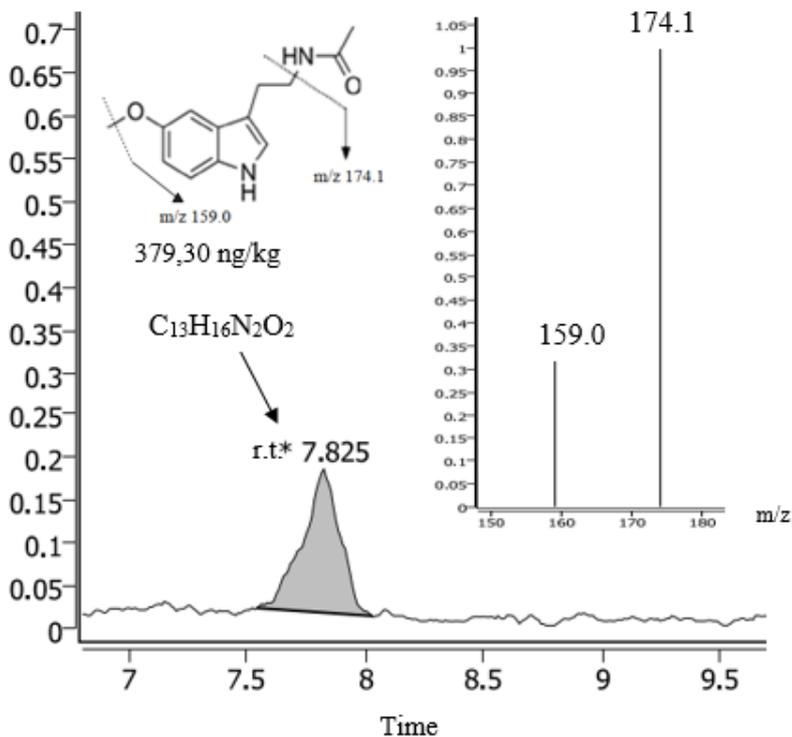
Verifica analitica del contenuto di melatonina in formaggio “Gran Moravia” e in formaggi di malga

Tabella 2. Campioni di formaggio Gran Moravia e determinazione della melatonina.

	lotto	stagionatura	melatonina ng/kg
1)	OG	8 mesi	330,0
2)	EG	8 mesi	333,4
3)	RG	8 mesi	489,8
4)	BG	9 mesi	521,7
5)	CG	11 mesi	588,9
6)	ZG	12 mesi	725,0
7)	SB	13 mesi	759,9
8)	RB	14 mesi	877,5
9)	HG	10 mesi	1.149,4

Grafico 2. Distribuzione % del contenuto di melatonina nei campioni di Gran Moravia della tabella precedente (Tabella 2)





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.

Per esemplificazione del metodo, si riporta il risultato grafico ottenuto per LC/MS/MS riferito a un campione maturato per tredici mesi di Gran Moravia (lotto RB) che 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.

I dati risultanti dai campioni di Gran Moravia, presi in esame in questa prima fase della ricerca, sono contenuti in un intervallo compreso fra 330 ng/kg e 1149,4 ng/kg, come riportato in Tabella 2.

Nella Tabella 3 successiva sono indicati i risultati della valutazione di melatonina in una serie di formaggi di malga.

Tabella 3. Campioni di formaggio di malga e determinazione della melatonina

formaggi di malga			
	tipologia	produttore	melatonina ng/kg
1)	pressato	malga Marcai	1.326,7
2)	mezzano	malga Marcai	520,8
3)	stravecchio	malga Marcai	1.353,2
4)	mezzano	malga Pusterle	n.d.
5)	stravecchio	malga Pusterle	2.974,1
6)	mezzano	malga Zebio	796,1
7)	mezzano	malga Dosso di Sotto	n.d.
8)	stravecchio	malga Dosso di Sotto	1.443,4

Cogollo del Cengio, 04 aprile 2025

Laboratori di Ricerche Analitiche BSC – “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
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
sito: www.brazzalesc.com
Laboratori di Ricerche Analitiche “Dr. Tino Brazzale”
Via Sant'Antonio, 2 – 36010 Cogollo del Cengio (VI) - Italia

