

I. Disposiciones generales

PRESIDENCIA DEL GOBIERNO

15959 REAL DECRETO 1149/1986, de 6 de junio, por el que se concede franquicia telegráfica para los radiotelegramas barco-tierra originados por los navegantes con motivo de las Elecciones a Cortes Generales 1986, convocadas por Real Decreto 794/1986, de 22 de abril, y Elecciones del Parlamento de Andalucía convocadas por Decreto del Presidente de la Junta de Andalucía, 73/1986, de 28 de abril.

Convocadas Elecciones al Congreso de los Diputados y al Senado por Real Decreto 794/1986, de 22 de abril («Boletín Oficial del Estado» 23), y Elecciones al Parlamento de Andalucía convocadas por Decreto del Presidente, 73/1986, de 28 de abril («Boletín Oficial de la Junta de Andalucía» del 29), se hace necesario dictar determinadas normas complementarias y de desarrollo de la normativa vigente,

En su virtud, a propuesta de los Ministros de Economía y Hacienda y de Transportes, Turismo y Comunicaciones y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 6 de junio de 1986,

DISPONGO:

Artículo único.—Será de aplicación a las Elecciones al Congreso de los Diputados y al Senado y a las Elecciones al Parlamento de Andalucía, el Real Decreto 440/1986, de 28 de febrero, por el que se concede franquicia telegráfica para los radiotelegramas barco-tierra originados por los navegantes con motivo del referéndum convocado por Real Decreto 214/1986, de 6 de febrero.

DISPOSICION FINAL

El presente Real Decreto entrará en vigor el mismo día de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid a 6 de junio de 1986.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de la Presidencia,
JAVIER MOSCOSO DEL PRADO Y MUÑOZ

15960 ORDEN de 12 de junio de 1986, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel.

Excelentísimos señores:

El Decreto de la Presidencia del Gobierno 2484/1967, de 21 de septiembre, que aprueba el Código Alimentario Español, prevé que puedan ser objeto de reglamentaciones especiales las materias en él reguladas.

Publicado el Real Decreto de la Presidencia del Gobierno 2519/1984, de 9 de agosto, que regula la entrada en vigor, aplicación y desarrollo del Código Alimentario Español, así como la Orden de Presidencia del Gobierno de 5 de agosto de 1983, por la que se aprueba la norma de calidad para la miel destinada al mercado interior, procede dictar como desarrollo del punto segundo de la citada Orden los correspondientes métodos oficiales de análisis.

En su virtud, a propuesta de los Ministerios de Economía y Hacienda, de Industria y Energía, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, previo informe preceptivo de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria y oídos los representantes de las organizaciones afectadas, esta Presidencia del Gobierno dispone:

Primero.—Se aprueban como oficiales los Métodos de Análisis para la miel que se citan en el anexo I.

Segundo.—Cuando no existan Métodos Oficiales para determinados análisis, y hasta tanto los mismos no sean propuestos por el órgano competente y previamente informados por la Comisión

Interministerial para la Ordenación Alimentaria, podrán ser utilizados los aprobados por los Organismos nacionales e internacionales de reconocida solvencia.

DISPOSICION FINAL

La presente disposición entrará en vigor a los veinte días de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Lo que comunico a VV. EE. para su conocimiento y efectos.
Madrid, 12 de junio de 1986.

MOSCOSO DEL PRADO Y MUÑOZ

Excmos. Sres. Ministros de Economía y Hacienda, de Industria y Energía, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo.

ANEXO I

1. Preparación de la muestra.
2. Prolina.
3. Análisis microscópico del sedimento.
4. Azúcares reductores.
5. Sacarosa aparente.
6. Composición en azúcares.
7. Acidez libre, láctónica y total.
8. Cenizas.
9. Humedad.
10. Hidroximetilfurfural.
11. Actividad diastásica.
12. Conductividad eléctrica.
13. Sólidos insolubles en agua.

1. Preparación de la muestra

1.1 Principio.—La muestra de laboratorio (que se supone ya confeccionada y representativa del lote) se homogeniza y trata adecuadamente a fin de que las fracciones alicuotas que de la misma se tomen para realizar los diversos análisis, es decir, las muestras analíticas sean representativas de la miel que se somete a examen.

1.2 Material y aparatos.

- 1.2.1 Malla de luz 200-250 μ m \times 200-250 μ m.
- 1.2.2 Malla de luz 500 \times 500 μ m.

1.3 Procedimiento.—Para la miel en panal, previamente, debe separarse del mismo, desoperculándolo si no lo está y recogiendo la miel por escurrimiento a través de un filtro de luz de malla 500 μ m \times 500 μ m.

1.3.1 Homogeneización.

Esta operación debe realizarse en todos los casos cualquiera que sea el análisis que posteriormente se pretenda realizar.

Si la miel se encuentra ya totalmente líquida, basta agitar con una espátula adecuada al tamaño de la muestra durante el tiempo suficiente.

Si la miel se encuentra parcial o totalmente cristalizada se debe agitar también pero durante un tiempo más largo, usando también una espátula adecuada al tamaño de la muestra. En el caso de que la miel se encontrara excesivamente consistente es necesario reblandecerla previamente en recipiente cerrado a una temperatura comprendida entre 25 y 30°C, ambas inclusive.

1.3.2 Licuación.

Debe realizarse necesariamente en caso de que sean destinadas a determinar la humedad y composición en azúcares.

Para el resto de los análisis no es necesaria.

No debe practicarse bajo ningún concepto para el caso de que se pretenda determinar el contenido de hidroximetilfurfural (HMF) o actividad diastásica.

Tomar una fracción de la muestra de laboratorio homogeneizada, de tamaño adecuado, introducir dentro de un recipiente de

vidrio pequeño y provisto de cierre hermético en donde se calienta hasta fusión de la temperatura de 50°C y durante el mínimo tiempo necesario. Agitar de cuando en cuando para favorecerla. Una vez conseguida, se saca de la estufa o baño María en donde se ha practicado la fusión y se enfría rápidamente.

1.3.3 Limpieza.

Debe procederse a la limpieza de la miel cuando ésta se ve excesivamente sucia por trozos de cera, piedrecitas, tierra, restos de insectos, etc.

No debe practicarse en el caso de pretender determinar el contenido de sólidos insolubles.

Calentar la muestra de laboratorio en baño María en unos 40°C en recipiente de vidrio herméticamente cerrados y filtrar a través de malla de una luz de 200-250 μ m por 200-250 μ m, enfriando en seguida el filtrado recogido.

Si se ha practicado la licuación puede aprovecharse cuando se encuentra caliente para filtrarla por el filtro de luz especificada, para no tener que volver a calentarla.

Si la miel se encuentra parcial o totalmente solidificada es necesario licuarla previamente a la filtración.

2. Prolina

2.1 *Principio.*—Reacción de la prolina con nihidrina en medio ácido y posterior determinación a 517 nm de la absorbancia del compuesto formado.

2.2 *Material y aparatos.*—2.2.1 Espectrofotómetro o colorímetro que permita efectuar lecturas a una longitud de onda de 517 nm.

2.2.2 Baño de agua.

2.2.3 Tubos de vidrio de 16 x 130 mm con tapón de rosca.

2.3 Reactivos.

2.3.1 Solución de nihidrina al 3 por 100 (p/v). Disolver 3,0 gramos de nihidrina en 100 mililitros de éter monometílico del etilenglicol exento de peróxidos.

2.3.2 Solución de isopropanol-agua (1:1) (v/v).

2.3.3 Ácido fórmico.

2.3.4 Disoluciones patrón de prolina (obtenidas de L (-) prolina desecada a vacío y conservada en desecador).

2.3.4.1 Disolución patrón a 0,5 mg/mililitros disolver en agua 50 mg de prolina y enrasar a 100 mililitros. Conservar en frigorífico esta disolución.

2.3.4.2 Disoluciones de trabajo. Preparar por dilución a partir de la disolución patrón, disoluciones con concentraciones comprendidas entre 5 y 50 μ g/mililitros. Tomar con una pipeta 25 mililitros de la disolución patrón (2.3.4.1) y llevar con agua a 250 mililitros. Esta disolución contiene 50 μ g de prolina/mililitros. Tomando alícuotas de esta disolución de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 mililitros y enrasando a 50 mililitros con agua se tiene una serie de disoluciones de trabajo en el rango de concentraciones indicado, con intervalos de 5 μ g/ de prolina/ml entre ellas.

2.4 Procedimiento.

2.4.1 Preparación de la recta de calibrado. De cada una de las disoluciones patrón de prolina recientemente preparadas tomar 0,5 mililitros en un tubo de ensayo (2.2.3), añadir 0,25 mililitros de ácido fórmico y 1,00 mililitros de disolución de nihidrina (2.3.1). Preparar un blanco utilizando 0,5 mililitros de agua destilada en lugar de la disolución patrón. Cerrar el tubo, agitar y colocar en un baño de agua a ebullición durante quince minutos. Enfría a 20°C durante cinco minutos, añadir 5 mililitros de disolución de isopropanol-agua (2.3.2). Agitar fuertemente y medir la absorbancia a 517 nm contra el blanco sometido al mismo tratamiento, efectuando la lectura dentro de los treinta y cinco minutos siguientes al enfriamiento. Representar la absorbancia frente a la concentración y trazar la recta de calibrado.

2.4.2 Determinación del contenido de prolina en la miel. Pesar, con precisión de 0,001 gramos, unos 2,5 gramos de miel, transferir con agua a un matraz aforado de 50 mililitros y enrasar con agua. Tomar 0,5 mililitros de esta disolución y operar del modo descrito en el punto 2.4.1. El color debido a la miel se corrige, determinando la absorbancia de una disolución que contenga 0,5 mililitros de la disolución de miel, 1,25 mililitros de agua y 5 mililitros de la disolución de isopropanol-agua. Este valor se resta de la absorbancia de la muestra antes de efectuar los cálculos. (Es necesario realizar un blanco con agua destilada).

2.5 *Cálculos.*—El resultado viene expresado por la siguiente fórmula:

$$\text{mg de prolina/100 g de miel} = \frac{5C}{P}$$

Siendo:

C = Concentración de prolina en la disolución de miel (μ g/mililitros) obtenida de la recta de calibrado.

P = Peso, en gramos, de la muestra de miel.

2.6. *Referencias bibliográficas.*—Asociación of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis (1980) 31.116, página 521.

3. Análisis microscópico del sedimento

3.1 *Principio.*—Dilución de la muestra, previamente homogeneizada, separación del sedimento y posterior examen microscópico del mismo.

Este método no es aplicable a mieles finamente filtradas.

3.2 Material y aparatos.

3.2.1 Centrifuga capaz de alcanzar 2.500-3.000 rpm provista de tubos de 10 mililitros graduados en el fondo.

3.2.2 Bomba de vacío provista de dispositivo de succión.

3.2.3 Microscopio de, al menos, 400 aumentos.

3.2.4 Micrómetro.

3.2.5 Agitador magnético.

3.2.6 Estufa o placa calefactora.

3.2.7 Pipeta «Pasteur» graduada.

3.2.8 Hilo de platino o similar.

3.3 Reactivos.

3.3.1 Alcohol etílico de 70°.

3.3.2 Fenol cristalizado.

3.3.3 Ácido sulfúrico 0,2 N.

3.3.4 Solución colorante de fucsina básica. Tomar 0,1 gramos de fucsina, añadir 1 mililitro de alcohol de 70° y completar hasta 250 mililitros con agua destilada.

3.3.5 Solución glicerina-gelatina. Pesar 7 gramos de gelatina, agregar 42 mililitros de agua destilada, dejar reposar veinticuatro horas, agregar 50 gramos de glicerina agitando continuamente y 0,5 gramos de fenol cristalizado. Calentar a 45° durante quince minutos, agregar unas gotas de la solución de fucsina básica y filtrar.

3.3.6 Bálsamo de Canadá o similar.

3.3.7 Cloroformo o éter etílico.

3.4 Procedimiento.

3.4.1 Preparación de pólenes de referencia. Tomar las anteras maduras de la flor y colocarlas en un vidrio de reloj. Desengrasar el polen mediante éter etílico. Evaporar el éter residual. Tomar una cantidad adecuada de polen mediante hilo de platino o similar y depositarle sobre el portaobjetos, procurando no arrastrar trozos de anteras. Añadir una gota de disolución colorante de fucsina y dejar evaporar en estufa o placa calefactora a una temperatura 30-40°C. A continuación añadir una gota de la mezcla de glicerina-gelatina (3.3.5), previamente licuada a unos 40°C, cubrir con un cubreobjetos y sellar la preparación con bálsamo de Canadá o similar. Enfría y limpiar.

3.4.2 Preparación de la muestra: Tomar de 10 a 20 gramos de miel, según su contenido en polen, previamente homogeneizada, e introducirla en un vaso de precipitados. Agregar 20 mililitros de ácido sulfúrico 0,2 N y disolver agitando, calentando a 40°C si es necesario. Centrifugar a 2.500-3.000 rpm durante diez minutos utilizando tubos de centrifuga de 10 mililitros graduados en el fondo. Eliminar el líquido sobrenadante por succión, lavar el sedimento con 10 mililitros de agua destilada y volver a centrifugar en las mismas condiciones. Volver a eliminar el líquido sobrenadante por succión hasta un volumen de 0,5 mililitros.

Agitar para una perfecta dispersión del sedimento en el volumen total. A continuación tomar, mediante pipeta «Pasteur» o similar, 0,02 mililitros y depositarlos uniformemente en el centro de un portaobjetos de una superficie aproximada de 2 x 2 centímetros, agregando una gota de la solución de fucsina básica y cubrir con un cubreobjetos. En el caso de querer conservar la preparación desecarla en una estufa o placa calefactora a 30-40°C agregando posteriormente la solución de glicerina-gelatina y sellar la preparación como se indica en 3.4.1.

3.4.3 Determinación: Preparar el microscopio introduciendo la preparación anterior para su examen, realizando el recuento sobre 1.200 granos y anotando la proporción de cada especie que aparecen en ellos, previa identificación con los pólenes de referencia.

3.5 *Expresión de los resultados.*—Expresar en tanto por ciento las proporciones de pólenes presentes.

3.6 Observaciones.

3.6.1 Este procedimiento puede utilizarse para conocer el modo de extracción o el grado de filtración de la miel, observando el volumen del sedimento después de centrifugación.

3.6.2 También puede utilizarse este procedimiento para la detección de otros elementos microscópicos del sedimento distintos del polen, pero utilizando en este caso una cantidad total de 600 elementos microscópicos distintos del polen, tales como esporas de hongos, fragmento de micelios, algas microscópicas, partículas que informan sobre el origen botánico y geográfico de la miel y polvo atmosférico, partículas minerales, fragmentos de insectos o granos de almidón que informan sobre la pureza de la miel.

3.7 *Referencias bibliográficas.*-Asociación de palinólogos de Lengua Española (APLE), 1980.

4. Azúcares reductores

4.1 *Principio.*-Método modificado de Lane Eynon que consiste en reducir la modificación de Soxhlet de la solución de Fehling titulándola en punto de ebullición y a volumen constante, con una solución de los azúcares reductores.

4.2 Reactivos.

4.2.1 Modificación de Soxhlet de la solución de Fehling.

Solución A: Disolver 69,28 gramos de sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada hasta obtener un litro de solución. Conservar durante un día antes de proceder a la titulación.

Solución B: Disolver 346 gramos de tartrato sódico potásico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 100 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) en agua destilada hasta obtener un litro. Filtrar con un filtro preparado de asbesto.

4.2.2 Solución de azul de metileno.

Disolver dos gramos en agua destilada hasta obtener un litro.

4.2.3 Crema de alúmina.

Preparar una solución fría saturada de alumbre [$\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$] en agua.

Añadir hidróxido amónico removiendo constantemente hasta obtener una solución alcalina que reaccione con tornasol, dejar que el precipitado sedimente y lavar por decantación con agua hasta que el agua procedente de lavados, tratada con solución de cloruro de bario, muestre sólo ligeros indicios de sulfato. Verter el agua sobrante y conservar la crema restante en una botella cerrada.

4.2.4 Solución patrón de azúcar invertido (10 g/l). Pesar exactamente 9,5 gramos de sacarosa pura, añadir 5 mililitros de ácido clorhídrico (ClH puro al 36,5 por 100 p/p aproximadamente) y disolver en agua hasta obtener unos 100 mililitros; conservar esta solución acidificada durante varios días a temperatura ambiente (siete días aproximadamente entre 12 y 15°C, o tres días entre 20 y 25°C) y diluir después hasta obtener un litro (N.B.: El azúcar invertido acidificado al 1 por 100 permanece estable durante varios meses). Neutralizar un volumen apropiado de esta solución con hidróxido de sodio 1N (40 g/l) inmediatamente antes de utilizarla y diluir hasta obtener la concentración necesaria (2 g/l) para la normalización.

4.3 Procedimiento.

4.3.1 Preparación de la muestra de ensayo. Primer procedimiento (aplicable a mieles que pueden contener sedimentos).

Tomar una muestra de 25 gramos de miel homogeneizada pesada exactamente y colocarla en un matraz volumétrico de 100 mililitros; añadir 5 mililitros de crema de alúmina (4.2.3) diluir en agua a 20°C hasta volumen y filtrar.

Diluir 10 mililitros de esta solución en agua destilada hasta obtener 500 mililitros (solución diluida de miel).

4.3.2 Preparación de la muestra de ensayo. Segundo procedimiento.

Pesar cuidadosamente una cantidad representativa de unos 2 gramos de la muestra de miel homogeneizada, disolver en agua destilada y diluir en un matraz graduado hasta obtener 200 mililitros de solución. Diluir 50 mililitros de la solución de miel en agua destilada hasta obtener 100 mililitros (solución diluida de miel).

4.3.3 Normalización de la solución de Fehling modificada.

Normalizar la solución A modificada de Fehling de forma que 5 mililitros exactamente mezclados con 5 mililitros aproximadamente de la solución B de Fehling, reaccionen completamente con 0,050 gramos de azúcar invertido, añadido en forma de 25 mililitros de solución diluida de azúcar invertido (2 g/l) (4.2.4).

De tal forma que el volumen final sea 35 mililitros.

4.3.4 Titulación preliminar.

Al final de la titulación de reducción, el volumen total de los reactivos añadidos deberá ser de 35 mililitros. Esto se consigue añadiendo el volumen adecuado de agua antes de comenzar la titulación. Puesto que en los criterios de composición de la norma para la miel se especifica que ésta debe contener más de un 60 por 100 de azúcares reductores (calculados como azúcar invertido), es necesaria una titulación preliminar para determinar el volumen de

agua que será preciso añadir a una muestra dada para asegurar que la reducción se realice a volumen constante. Para calcular el volumen de agua que es preciso añadir se resta de 25 mililitros el volumen de solución diluida de miel, que se ha consumido en la titulación preliminar (x ml).

Verter con una pipeta 5 mililitros de solución A de Fehling en un matraz Erlenmeyer de 250 mililitros añadir aproximadamente 5 mililitros de solución B de Fehling.

Añadir unos 12 mililitros de agua destilada, un poco de pomez en polvo u otro regulador adecuado de la ebullición y echar con una bureta unos 11 ml de solución diluida de miel. Calentar la mezcla fría sobre una tela metálica hasta ebullición y mantener en ebullición moderada durante dos minutos. Añadir un mililitro de solución acuosa de azul de metileno al 0,2 por 100, sin interrumpir la ebullición y completar la titulación sin que el tiempo total de ebullición pase de tres minutos, con pequeñas adiciones repetidas de solución diluida de miel, hasta que el indicador pierda el color. Lo que hay que observar es el color del líquido que permanece en la parte superior. Tomar nota del volumen total de solución diluida de miel (x ml) que se ha utilizado.

4.3.5 Determinación.

Calcular la cantidad de agua que es necesario añadir para que, al final de la titulación, el volumen total de los reactivos sea de 35 mililitros, para ello, restar de 25 mililitros la titulación preliminar (x ml).

Verter con una pipeta 5 mililitros de solución A de Fehling en un matraz Erlenmeyer de 250 mililitros y añadir aproximadamente 5 mililitros de solución B de Fehling.

Añadir (25 - x) mililitros de agua destilada, un poco de pomez en polvo u otro regulador adecuado de la ebullición con una bureta, todo el volumen menos 1,5 mililitros de solución diluida de miel determinada en la titulación preliminar. Calentar la mezcla fría sobre una tela metálica hasta ebullición y mantener en ebullición moderada durante dos minutos. Añadir 1,0 mililitros de solución de azul de metileno al 0,2 por 100 sin interrumpir la ebullición y completar la titulación, sin que el tiempo total de ebullición pase de tres minutos, con pequeñas adiciones repetidas de solución diluida de miel hasta que el indicador pierda el color. Tomar nota del volumen total de solución diluida de miel (V ml). La diferencia entre titulaciones duplicadas no deberá ser superior a 0,1 mililitros.

4.4 *Cálculos.*-El resultado se expresará como gramos de azúcares invertidos en 100 gramos de miel y se calculará aplicando las siguientes fórmulas:

Cuando se haya utilizado el primer procedimiento (4.3.1):

$$C = \frac{25}{P1} \times \frac{1.000}{V1}$$

Cuando se haya utilizado el segundo procedimiento (4.3.2):

$$C = \frac{2}{P2} \times \frac{1.000}{V2}$$

Siendo:

P1 - Peso, en gramos, de la muestra de miel utilizada en (4.3.1).

P2 - Peso, en gramos, de la muestra de miel utilizada en (4.3.2).

V1 - Volumen, en mililitros, de la solución diluida de miel consumida durante la determinación efectuada según el procedimiento (4.3.1).

V2 - Volumen, en mililitros, de la solución diluida de miel consumida durante la determinación efectuada según el procedimiento (4.3.2).

4.5 *Observaciones.*-Para la exactitud y reproductibilidad de la determinación es esencial establecer para cada muestra individual, cuál es el volumen de agua necesario para obtener un volumen total de mezcla reactiva de 35 mililitros. El cuadro que se indica a continuación presenta algunos volúmenes típicos que es posible encontrar en la titulación preliminar para los contenidos de incremento de azúcar invertido indicados, en el supuesto de que la muestra de ensayo (4.3.1) pese unos 15 gramos o que la muestra de ensayo (4.3.2) pese unos 2 gramos.

| Contenido de azúcar invertido | Volumen de agua destilada que ha de añadirse |
|-------------------------------|--|
| Porcentaje | ml |
| 60 | 8,3 |
| 65 | 9,6 |
| 70 | 10,7 |
| 75 | 11,6 |

5. Sacarosa aparente

5.1 *Principio.*—El contenido de sacarosa aparente vendrá dado por la diferencia del poder reductor de los azúcares después y antes de la inversión. El contenido de azúcares se determinará según el método 4.

5.2 Reactivos.

5.2.1 Modificación de Soxhlet de la solución de Fehling (4.2.1).

5.2.2 Solución patrón de azúcar invertido (4.2.4).

5.2.3 Solución de ácido clorhídrico 6,34N.

5.2.4 Solución de hidróxido de sodio 5N.

5.2.5 Solución de azul de metileno (4.2.2).

5.3 Procedimiento.

5.3.1 Preparación de la muestra. Según (4.3.1). Diluir 10 mililitros de esta solución en agua destilada hasta obtener 250 mililitros de solución de miel.

5.3.2 Preparación de la muestra. Segundo procedimiento, como se indica en (4.3.2).

5.3.3 Hidrólisis de la muestra de ensayo.

Poner la solución de miel (50 ml) en un matraz graduado de 100 mililitros, junto con 25 mililitros de agua destilada; calentar la muestra de azúcar hasta una temperatura de 64°C en un baño de agua en ebullición.

Retirar a continuación el matraz del baño de agua y añadir 10 mililitros de ácido clorhídrico (5.2.3). Dejar que la solución se enfríe de un modo natural durante quince minutos, y a continuación llevarla hasta 20°C y neutralizarla con hidróxido de sodio (5.2.4) empleando tornasol como indicador. Enfríar de nuevo y completar el volumen hasta 100 mililitros (solución diluida de miel).

5.3.4 Titulación y determinación.

Según se indica en (4.3.4) y (4.3.5).

5.4 *Cálculos.*—Calcular el tanto por ciento de azúcar invertido (gramos de azúcar invertido por 100 gramos de miel) después de la inversión, utilizando la fórmula apropiada que para obtener el tanto por ciento de azúcar invertido antes de la inversión se emplea en (4.4).

Contenido en sacarosa aparente:

Contenido de azúcar invertido después de la inversión menos contenido de azúcar invertido antes de la inversión por 0,95.

El resultado se expresa en gramos de sacarosa aparente por 100 gramos de miel.

6. Composición en azúcares

6.1 *Principio.*—Se preparan los trimetilsilil derivados de las oximas en los azúcares de la muestra, se separan y detectan por cromatografía, de gases en temperatura programada y doble canal, y se cuantifican mediante la técnica del patrón interno.

6.2. Material y aparatos.

6.2.1 Equipo de cromatografía de gases con dos detectores de ionización de llama (FID).

6.2.2 Dos columnas cromatográficas de acero inoxidable de 3 metros de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro interior, con un relleno constituido por un 4 por 100 de fase estacionaria no polar del tipo fenil-metil silicona depositada sobre un soporte granular de tierra de diatomeas de tamaño de partícula entre 100 y 120 micras, lavada con ácido y posteriormente desactivada con clorometildisilazano (SE-52 o similar).

6.2.3 Microjeringa graduada en 0,1 microlitros, para cromatografía de gases y de longitud de aguja adecuada al inyector del cromatógrafo.

6.2.4 Tamiz o malla de una luz comprendida entre 100 y 200 micras.

6.2.5 Baño termostático a 60°C.

6.2.6 Tubos de vidrio con tapón roscado y junta de teflón de unos 18 mililitros de capacidad (longitud, 10 centímetros, y diámetro interior, 1,6 centímetros) y de unos 6 mililitros de capacidad (longitud, 10 centímetros, y diámetro interno, un centímetro).

6.3 Reactivos.

6.3.1 D(+) Xilosa pura anhidra (C₅H₁₀O₅).

6.3.2 Clorhidrato de hidroxilamina (NH₂OH)HCl.

6.3.3 Piridina anhidra (C₅NH₅).

6.3.4 Sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄).

6.3.5 1,1,1,3,3,3, - Hexametildisilazano (C₆H₁₉N Si₃).

6.3.6 Acido trifluoroacético (CF₃ - COCH₃).

6.3.7 Azúcares patrones:

D(-) Fructosa pura anhidra (C₆H₁₂O₆).

D(+) Glucosa pura monohidratada (C₆H₁₂O₆ · 1H₂O).

Sacarosa pura anhidra (C₁₂H₂₂O₁₁).

Maltosa pura monohidratada (C₁₂H₂₂O₁₁ · 1H₂O).

Rafinosa pura pentahidratada (C₁₈H₃₂O₁₆ · 5H₂O).

D(+) Melizitosa pura monohidratada
(C₁₈H₃₂O₁₆ · 1H₂O).

6.4 Procedimiento.

6.4.1 Preparación de reactivos.

Disolución de patrón interreactivo de oximación: Dentro de un vaso de precipitados de 100 mililitros, se pesa, apreciando hasta 0,1 miligramos, 0,4000 gramos de xilosa pura anhidra (6.3.1). Seguidamente, se pesan dentro del mismo vaso y apreciando hasta el centímetro, 5 gramos de clorhidrato de hidroxilamina (6.3.2).

Se disuelve el contenido del vaso agregándole unos 80 mililitros de piridina anhidra (6.3.3), traspasando posteriormente tal disolución al interior de un matraz aforado de 100 mililitros. Se recogen con piridina los residuos del vaso y se enrasan a 100 mililitros y a 20°C homogeneizando después de la disolución.

En caso de tener que guardar por mucho tiempo esta disolución, introducirla en nevera a unos 0-5°C.

Preparación de la disolución patrón de calibración: Es necesario preparar esta disolución en el caso de tener que realizar la calibración.

Dentro de un vaso de precipitados de 50 mililitros se introducen y pesan con precisión de 0,1 miligramos aproximadamente las cantidades de las siguientes sustancias:

| Sustancias | Peso en gramos de la sustancia | Porcentaje de la sustancia seca |
|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| D(+) Xilosa pura anhidra | 0,3457 | 20,0000 |
| D(-) Fructosa pura anhidra | 0,6000 | 34,7122 |
| D(+) Glucosa pura monohidratada | 0,5513 | 28,9962 |
| Sacarosa pura anhidra | 0,0900 | 5,2068 |
| Maltosa pura monohidratada | 0,0960 | 5,2184 |
| Rafinosa pura pentahidratada | 0,0598 | 2,9332 |
| D(+) Melezitosa pura Monhidratada | 0,0525 | 2,9332 |
| | 1,7943 | 100,0000 |
| Agua destilada | 0,4000 | |

Se añade el agua al vaso y se disuelve completamente su contenido mediante sucesivas porciones de piridina anhidra (6.3.3), disolución que suele ser muy lenta. Para abreviarla o completarla es adecuado calentar ligeramente, o/y aplicar ultrasónicos.

Hechas las disoluciones, se introducen en un matraz aforado de 100 mililitros.

Con unos pocos mililitros de piridina se recoge perfectamente el residuo del vaso y se introduce en el matraz. Finalmente se enrasa a 100 mililitros y a 20°C y se homogeneiza la disolución.

6.4.2 Determinación del contenido en azúcares.

Preparación de la muestra problema: Se toma un peso de miel de aproximadamente 1 gramo, exactamente conocido hasta 0,1 miligramo, que debe ser totalmente líquida y nítida. En caso contrario, debe licuarse en recipiente cerrado a 60°C y posteriormente filtrarse a través de un cedazo o malla de una luz entre 100 y 200 micras.

Sobre la muestra depositada dentro de un vaso de precipitados de 50 mililitros, se agregan unos 30 mililitros de disolución patrón interreactivo de oximación, con los cuales se debe disolver totalmente aquella muestra, introduciéndola posteriormente a un matraz aforado de 50 mililitros. Mediante disolución patrón-reactivo de oximación, se recogen completamente los residuos del vaso, se introducen dentro del matraz, se enrasa y se homogeneiza la disolución obtenida.

Deshidratación: En el interior de un tubo de vidrio (6.2.6) de unos 18 mililitros de capacidad, se pesan unos 2 gramos de sulfato de magnesio (6.3.4), apreciando hasta el centímetro. Seguidamente mediante pipeta se introducen 5 mililitros de la disolución de muestra problema de miel anteriormente preparada. Luego se dispersa el sulfato magnésico agitando vigorosamente el tubo durante unos dos minutos.

Obtenida la dispersión, se deja el tubo en reposo y posición horizontal y a temperatura ambiente, durante por lo menos doce horas.

Silicización y oximación: Transcurrido este tiempo, se agita el contenido del tubo y se deja en reposo en posición vertical durante el tiempo suficiente para que se formen dos capas perfectamente separadas, una superior líquida completamente nítida y otra inferior sólida de color blanco.

Mediante una pipeta y con sumo cuidado para no arrastrar fase sólida, se toma, ayudándose de una perilla de goma para la succión,

un mililitro de la fase líquida, la cual se introduce en un tubo de vidrio (6.2.6) de unos 8 mililitros de capacidad.

Seguidamente se agrega un mililitro de hexametilxilazano (6.3.5) mediante una pipeta, y se agita vigorosamente el tubo durante un par de minutos. Posteriormente se agrega 0,1 mililitros de ácido trifluoroacético (6.3.6) mediante una pipeta de 0,1 mililitro (6.2.8). Se agita el tubo durante otro par de minutos.

Seguidamente se deposita el tubo en posición vertical y bien cerrado, en el interior de un baño termostático 60°C donde debe permanecer por espacio de una hora, transcurrida la cual, se debe sacar el tubo, limpiar exteriormente, agitar y dejar en reposo en posición vertical a temperatura ambiente con objeto de que se enfríe y se separen perfectamente dos fases, una inferior sólida y otra superior líquida, proceso que suele tardar de cuarenta y cinco a sesenta minutos. El proceso se puede acelerar por centrifugación. La muestra está entonces lista para ser cromatografiada.

Cromatografía: Las condiciones de operación a introducir en el cromatógrafo son las siguientes (algunas se dan a título orientativo puesto que dependen del aparato utilizado):

Temperatura y tiempos:

Inicial de horno: 205°C; cero minutos.

Final de horno: 280°C; unos treinta y cinco minutos.

Rampa: 2°C/minutos.

Inyector: 280°C.

Detector: 290°C.

Gases y flujo:

Naturaleza del gas portador: Nitrógeno puro.

Flujo: Depende de la columna. Hay que buscar el flujo adecuado para una óptima resolución en base a la curva de Van Deemter y resultados empíricos de ensayos previos con diversos flujos. Oscila normalmente entre 19 y 23 ml/minuto a las condiciones de trabajo de columna.

Detección:

Tipo de detectores: Detectores de ionización de llama (FID).

Flujo de gases de combustión: A determinar mediante ensayos para obtener la respuesta óptima.

Número de detectores: Dos conectados a dos columnas, estando conectado a polaridad negativa el detector por donde circula la muestra.

Atenuación de la señal: Debe aplicarse la atenuación adecuada para que los picos del cromatograma caigan dentro del papel.

Debe aplicarse diferente atenuación para los monosacáridos, disacáridos y trisacáridos.

Amplificación $\times 10$, orientativamente, la siguiente atenuación: monosacáridos, 2^o; disacáridos, 2^o; trisacáridos, 2^o.

Una vez estabilizado el aparato en las condiciones de operación, se procede a inyectar la muestra analítica, tomando mediante una microjeringa adecuada (6.2.4) 2 microlitros de la fase líquida del tubo que contiene aquella, los cuales se introducen dentro del inyector del cromatógrafo, iniciando inmediatamente el proceso cromatográfico de separación y detección de los azúcares componentes, accionando el mecanismo de disparo del cromatógrafo.

Identificación de los picos del cromatograma: La identificación de los picos correspondientes a los componentes azúcares de la muestra inyectada se realiza en base a la experiencia. No obstante, se puede realizar también sin esta experiencia conociendo previamente los tiempos de retención relativos de cada uno de los azúcares para la fase estacionaria empleada y la temperatura de operación.

Seguidamente se expone una tabla orientativa en la que figuran tales tiempos de retención relativos (TRR) en relación a la sacarosa y en el orden de su emergencia.

$$T, RR = \frac{t_i}{t_{\text{sacarosa}}} - 0,5 - 0,5$$

| AZÚCAR | TRR (X) |
|--------------------|---------|
| Xilosa | 0,139 |
| Fructosa | 0,257 |
| Glucosa-1 | 0,293 |
| Glucosa-2 | 0,307 |
| Sacarosa | 1,000 |
| Trehalosa | 1,120 |
| Isomaltosa-1 | 1,219 |
| Isomaltosa-2 | 1,232 |
| Maltosa-1-Turanosa | 1,257 |
| Maltosa-2 | 1,272 |
| Kojibiosa | 1,329 |
| Gentibiosa | 1,353 |
| Melibiosa-1 | 1,393 |
| Melibiosa-2 | 1,442 |
| Rafinosa-1 | 1,977 |

| AZÚCAR | TRR (X) |
|--------------|---------|
| Melezitosa-1 | 2,067 |
| Rafinosa-2 | 2,372 |
| Erlosa | 2,503 |
| Melezitosa-2 | 2,617 |
| Maltotriosa | - |

Los sufijos numéricos después del nombre del azúcar indican que el azúcar presenta más de un pico y además su orden de emergencia.

6.4.3 **Calibración.**—La calibración consiste en determinar los denominados «factores másicos de corrección o respuesta».

Estos deben siempre determinarse al inicio de una columna y deben comprobarse de cuando en cuando a lo largo de la vida de la misma.

Para la calibración se procede de manera parecida a la de la muestra problema de miel.

La calibración se debe hacer sobre, por lo menos, tres determinaciones analíticas.

Toma y preparación de la muestra de calibración: Dentro de un tubo de vidrio de unos 18 mililitros de capacidad (6.2.6) se introducen 250 miligramos de clorhidrato de hidroxilamina (6.3.2) pesados con precisión del centigramo. Se agregan 5 mililitros de la disolución patrón preparada para este fin, mediante una pipeta de esta cabida. Se agita energicamente hasta la total disolución del sólido.

Deshidratación: Se procede tal y como se ha dicho para la muestra problema de miel.

Silanización y oximación: Se procede tal y como se ha dicho para la muestra problema de miel.

Cromatografía.—Se procede igualmente que para la cromatografía de la muestra problema de miel.

Identificación de los picos del cromatograma.—Se procede tal como se ha dicho para la muestra problema de miel.

Cálculo de los factores másicos de respuesta o corrección: Para cada una de las determinaciones analíticas, se calculan los factores para cada uno de los azúcares, aplicando la siguiente fórmula:

$$f_i = \frac{m_i}{m_p} \cdot \frac{A_p}{A_i}$$

Siendo:

f_i = Factor buscado para el azúcar genérico i .

m_i = Porcentaje (sustancia seca) del componente genérico i en la muestra analítica patrón inyectada, conocida por cálculo a partir de los datos de pesada.

m_p = Porcentaje del patrón interno (xilosa) en la muestra analítica patrón, conocida por cálculo a partir de los resultados de pesada (20,000 por 100).

A_i = Área calculada para el pico del componente genérico i en el cromatograma.

A_p = Área calculada para el pico del componente patrón interno (xilosa) en el cromatograma.

Seguidamente se calcula la media aritmética de los n resultados de las n inyecciones para cada uno de los azúcares componentes de la disolución patrón.

$$f_i = \left(\sum f_i \right) / n \quad 3 \leq n \leq 10$$

Este valor de f_i es el denominado factor de respuesta.

6.5 **Cálculos.**—El porcentaje de cada azúcar componente se calcula aplicando la siguiente fórmula de cálculo:

$$\% m_i = f_i \cdot (A_i/A_p) \cdot (m_p/M) \cdot 100$$

siendo:

$\% m_i$ = Porcentaje del azúcar genérico i en la sustancia analizada.

f_i = Factor de respuesta másico de este componente i .

A_i = Área del pico de este componente i en el cromatograma.

A_p = Área del pico del componente patrón interno (xilosa) en el cromatograma.

m_p = Masa de patrón interno agregado a la masa M de muestra analítica tomada.

M = Masa de muestra problema de miel tomada.

100 = Factor de porcentaje.

6.6 **Observaciones.**—En el caso de que quiera reducirse el tiempo de deshidratación, puede realizarse ésta mediante calentamiento a temperatura máxima de 60°C y bajo vacío elevado, directamente en la miel.

6.7 **Referencias bibliográficas.**

1. Método modificado di dossaggio degli succheri del miele mediante Cromatografía in fase gaseosa. J. Pontallier, C. Rognons.

2. La determinación des glucides par G.L.C. et validité de la méthode pour la caracterisation des miels. M. Benardini Battaglini, C. Bosi.

7. Acidez libre, láctónica y total

7.1 *Principio.*-La miel contiene ácidos orgánicos libres y lactona. Estas últimas originan los ácidos correspondiente cuando la miel se alcaliniza constituyendo una reserva potencial de acidez. La acidez libre se determina por valoración potenciométrica con álcali hasta pH 8,50, y la acidez láctónica por valoración de retroceso tras la adición de un exceso conocido de base.

7.2 Material y aparatos.

7.2.1 pH-metro equipado con electrodos de vidrio y calomeianos.

7.2.2 Agitador magnético.

7.2.3 Microburetas de 10 mililitros.

7.3 Reactivos.

7.3.1 Solución de hidróxido de sodio 0,05 N.

7.3.2 Solución de ácido clorhídrico 0,05 N.

7.4 *Procedimiento.*-Pesar 10 gramos de miel en un vaso de precipitados de 100 mililitros y disolverlos con 75 mililitros de agua destilada exenta de dióxido de carbono. Sumergir en esta disolución los electrodos del pH-metro, agitar con un agitador magnético y adicionar la disolución de hidróxido de sodio (7.3.1) con una microbureta de 10 mililitros a una velocidad de 5 mililitros/minuto. La adición se detiene cuando el valor del pH es de 8,50. Añadir en seguida con pipeta 10 mililitros de la misma disolución y sin pérdida de tiempo, valorar por retroceso con la disolución de ácido clorhídrico (7.3.2) con otra microbureta de 10 mililitros hasta llegar a pH 8,30.

Es necesario efectuar paralelamente un ensayo en blanco.

7.5 Cálculos.

$$7.5.1 \text{ Acidez libre (meq/Kg)} = \frac{(V_b - V_o) N_b \cdot 1.000}{P}$$

$$7.5.2 \text{ Acidez láctónica (meq/Kg)} = \frac{(10 N_b - V_a N_a) \cdot 1.000}{P}$$

7.5.3 Acidez total = Acidez libre + Acidez láctónica.

Siendo:

V_b = Volumen, en mililitros, de base consumido para alcanzar pH 8,50.

V_o = Volumen, en mililitros, de base consumidos por 75 mililitros de agua destilada para alcanzar pH 8,50.

V_a = Volumen, en mililitros, de ácido gastado en la valoración por retroceso para alcanzar pH 8,30.

N_b = Normalidad de la base.

N_a = Normalidad del ácido.

P = Peso, en gramos, de la muestra.

7.6 *Observaciones.*-Para una buena reproducibilidad del método es necesario valorar con la rapidez indicada en el procedimiento, con buena agitación y sin disminuir la velocidad de adición de álcali en las proximidades de pH 8,50, ya que el valor del pH desciende rápidamente debido a la hidrólisis de las lactonas.

7.7 *Referencias bibliográficas.*-Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis (1980) 31.160, pág. 528.

8. Cenizas

8.1 *Principio.*-Calcínación de la muestra a 550° y pesada del residuo hasta peso constante.

8.2 *Material y aparatos.*-Cápsulas o crisoles de platino o material inalterable en las condiciones de trabajo.

8.3 *Procedimiento.*-Pesar, con precisión de 0,1 miligramo, de 5 a 10 gramos de miel, preparada según método número 1.

Poner la muestra en una cápsula o crisol (8.2.1) previamente calcinada y tarada.

Calentar suavemente hasta que la muestra se ennegrezca y seque y no haya peligro de pérdidas por formación de espuma o rebosamiento. Puede utilizarse una lámpara de rayos infrarrojos para carbonizar la muestra. En caso necesario puede añadirse unas gotas de aceite de oliva para impedir la formación de espuma. Introducir la muestra en la mufla a 550 °C y mantenerla hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas efectuadas a intervalos de treinta minutos sea inferior a 1 miligramo (cenizas sin residuos carbonosos).

8.4 *Cálculos.*-El contenido en cenizas expresado en porcentaje (p/p) vendrá dado por la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{(P_1 - P_2) \cdot 100}{P - P_2}$$

Siendo:

P = Peso, en gramos, de la cápsula o crisol con la muestra.

P_1 = Peso, en gramos, de la cápsula o crisol con las cenizas.

P_2 = Peso, en gramos, de la cápsula o crisol vacío.

9. Humedad

9.1 *Principio.*-Medida del índice de refracción de la miel y cálculo de la humedad mediante tablas.

9.2 *Material y aparatos.*-Refractómetro con baño termostático.

9.3 *Procedimiento.*-Tomar una muestra de miel licuada preparada según método 1 y medir el índice de refracción una vez la muestra haya alcanzado una temperatura de 20 °C ± 1 °C.

9.4 *Cálculos.*-Utilizar la tabla adjunta para convertir la lectura del índice de refracción en contenido de humedad expresado en tanto por ciento (p/p).

Si la medida del índice de refracción no se efectúa a 20 °C exactamente, efectuar las siguientes correcciones de temperatura:

Temperaturas superiores a 20 °C: Añadir 0,00023 por °C.

Temperaturas inferiores a 20 °C: Restar 0,00023 por °C.

TABLA DE CHATAWAY Y REVISADA POR WEDMORE PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

| Índice de refracción 20 °C | Contenido de humedad Porcentaje | Índice de refracción 20 °C | Contenido de humedad Porcentaje |
|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 1,5044 | 13,0 | 1,4966 | 16,0 |
| 1,5038 | 13,2 | 1,4961 | 16,2 |
| 1,5033 | 13,4 | 1,4956 | 16,4 |
| 1,5028 | 13,6 | 1,4951 | 16,6 |
| 1,5023 | 13,8 | 1,4946 | 16,8 |
| 1,5018 | 14,0 | 1,4940 | 17,0 |
| 1,5012 | 14,2 | 1,4935 | 17,2 |
| 1,5007 | 14,4 | 1,4930 | 17,4 |
| 1,5002 | 14,6 | 1,4925 | 17,6 |
| 1,4997 | 14,8 | 1,4920 | 17,8 |
| 1,4992 | 15,0 | 1,4915 | 18,0 |
| 1,4987 | 15,2 | 1,4910 | 18,2 |
| 1,4982 | 15,4 | 1,4905 | 18,4 |
| 1,4976 | 15,6 | 1,4900 | 18,6 |
| 1,4971 | 15,8 | 1,4895 | 18,8 |
| 1,4890 | 19,0 | 1,4810 | 22,2 |
| 1,4885 | 19,2 | 1,4805 | 22,4 |
| 1,4880 | 19,4 | 1,4800 | 22,6 |
| 1,4875 | 19,6 | 1,4795 | 22,8 |
| 1,4870 | 19,8 | 1,4790 | 23,0 |
| 1,4855 | 20,0 | 1,4785 | 23,2 |
| 1,4860 | 20,2 | 1,4780 | 23,4 |
| 1,4855 | 20,4 | 1,4775 | 23,6 |
| 1,4850 | 20,6 | 1,4770 | 23,8 |
| 1,4845 | 20,8 | 1,4765 | 24,0 |
| 1,4840 | 21,0 | 1,4760 | 24,2 |
| 1,4835 | 21,2 | 1,4755 | 24,4 |
| 1,4830 | 21,4 | 1,4750 | 24,6 |
| 1,4825 | 21,6 | 1,4745 | 24,8 |
| 1,4820 | 21,8 | 1,4740 | 25,0 |
| 1,4815 | 22,0 | | |

10. Hidroximetilfurfural

10.1 *Principio.*-Defecación de la muestra y medida de la absorbancia a 284 y 336 nm.

10.2 *Material y aparatos.*-10.2.1 Espectrofotómetro capaz de medir a una longitud de onda de 284 a 336 nm.

10.2.2 Cubetas de 1 centímetro de paso de luz.

10.3 Reactivos.

10.3.1 Solución Carrez I.-Disolver 15 gramos de ferrocianuro de potasio trihidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) y diluir a 100 mililitros con agua destilada.

10.3.2 Solución Carrez II.-Disolver 30 gramos de acetato de cinc dihidratado [$Zn(AcO)_2 \cdot 2H_2O$] y disolver a 100 mililitros con agua destilada.

10.3.3 Solución de sulfito ácido de sodio al 0,20 por 100. Disolver 0,20 gramos de sulfito ácido de sodio ($NaHSO_3$) y diluir a 100 mililitros con agua destilada.

10.3.4 Solución de sulfito ácido de sodio al 0,10 por 100. Hacer una disolución (1:1) con agua destilada de la solución (10.3.3).

10.4 *Procedimiento*.—Pesar, con precisión de 1 miligramo, 5 gramos de miel (que no haya sido calentada) en un vaso de precipitados, disolverla con 25 mililitros de agua destilada y transferirla a un matraz aforado de 50 mililitros. Añadir 0,50 mililitros de solución Carrez I, mezclar, añadir 0,50 mililitros de la solución Carrez II, mezclar y diluir hasta el enrase con agua destilada. Para eliminar la espuma se pueden añadir unas gotas de etanol. Filtrar con papel de filtro y desechar los primeros 10 mililitros de filtrado.

En sendos tubos de ensayo de 18 x 150 milímetros pipetear 5 mililitros de los filtrados. Añadir a uno de los tubos 5,0 mililitros de agua (muestra) y al otro 5,0 mililitros de la solución sulfito ácido de sodio (10.3.3) (referencia). Mezclar bien y determinar la absorbancia de la solución muestra frente a la de referencia a 284 nm y a 336 nm. Si la Absorbancia es superior a 0,6, diluir la solución de la muestra con agua y la solución de referencia diluirla en la misma proporción con una solución de sulfito ácido de sodio (10.3.4); leer nuevamente la absorbancia.

10.5 *Cálculos*.—El contenido de hidroximetilfurfural expresado en mg por 100 gramos de miel vendrá dado por la siguiente fórmula:

$$\text{HMF (mg/100 g)} = \frac{(A_1 - A_2) \times f \times 5}{P}$$

Siendo:

A_1 = Absorbancia medida a 284 nm.

A_2 = Absorbancia medida a 336 nm.

P = Peso, en gramos, de la muestra.

f = 14,97 para expresión en mg/100 gramos. El cálculo de este factor corresponde a la referencia dada en 10.6.

10.6 *Referencia bibliográfica*.—Journal Association of Official Analytical Chemists (vol. 62, número 3.197).

11. Actividad diastásica

11.1 *Principio*.—Se basa en la velocidad de hidrólisis del almidón, de una solución al 1 por 100, por las diastasas contenidas en una solución amortiguada de miel; el punto final de dicha reacción se determina tomando muestras de la mezcla a diferentes intervalos de tiempo midiendo la absorbancia a 660 nm.

11.2 *Material y aparatos*.

11.2.1 Baño termostático a $40 \pm 0,2$ °C.

11.2.2 Espectrofotómetros capaz de medir a una longitud de onda de 660 nm.

11.2.3 Cubetas de 1 centímetro de paso de luz.

11.3 *Reactivos*.

11.3.1 Solución patrón de yodo: Disolver 8,80 gramos de yodo calida para análisis en 30-40 mililitros de agua destilada que contenga 22,0 gramos de yoduro de potasio, calidad para análisis; diluir hasta 1 litro en matraz volumétrico.

11.3.2 Solución de yodo, 0,02 N. Disolver 20,0 gramos de yoduro de potasio, calidad para análisis, en 30-40 mililitros de agua destilada. Trasvasar la solución a un matraz de 500 mililitros, agregar 143 mililitros de la solución patrón de yodo (11.3.1). Mezclar y enrasar con agua destilada. Esta solución dura como máximo un día.

11.3.3 Solución de yodo, 0,0007 N. Disolver 20,0 gramos de yoduro de potasio (KI) en 30-40 mililitros de agua destilada, añadir 5,0 mililitros de solución patrón de yodo y diluir hasta 500 mililitros en matraz volumétrico.

Esta solución sólo es estable durante cuarenta y ocho horas.

11.3.4 Amortiguador de acetato pH 5,3 (1,59 M): Disolver 87,0 gramos de acetato de sodio trihidratado ($\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en 400 mililitros de agua destilada, añadir unos 10,5 mililitros de ácido acético glacial (HOAc) en un poco de agua y completar hasta 500 mililitros de volumen. Ajustar el pH a 5,3 con acetato de sodio o ácido acético, según convenga, utilizando pH-metro.

11.3.5 Solución de cloruro de sodio 0,5 M: Disolver 14,5 gramos de cloruro de sodio (ClNa) en agua destilada hervida y diluir hasta 500 mililitros.

11.3.6 Solución de almidón: Debe utilizarse un almidón soluble cuyo índice de azul se halle comprendido entre 0,50 y 0,55 (para la determinación del índice de azul, ver más adelante).

Pesar una cantidad de almidón soluble equivalente a 2,0 gramos de almidón anhidro (comprobar previamente la humedad por desecación a 130 °C); mezclar con 90 mililitros de agua, ponerlo a hervir rápidamente, agitando continuamente la solución. Hervir suavemente durante tres minutos, tapar y enfriar. Trasvasar a un matraz volumétrico de 100 mililitros, poner el matraz en el baño María (11.2.1) a 40 °C hasta que el líquido alcance dicha temperatura y completar hasta volumen a 40 °C.

Determinación del índice de azul del almidón: Disolver según el método anterior una cantidad equivalente a 1 g de almidón anhidro, enfriar la solución, añadir 2,5 mililitros de amortiguador

de acetato (11.3.4) y completar hasta 100 mililitros de volumen en matraz volumétrico. Verter, en un matraz volumétrico de 100 mililitros, 75 mililitros de agua, 1 mililitro de ácido clorhídrico (HCl) 1N y 1,5 mililitros de solución de yodo, 0,02N (11.3.2). A continuación añadir 0,5 mililitros de solución de almidón y completar con agua destilada hasta volumen. Dejar reposar una hora en la oscuridad y leer después la absorbancia en espectrofotómetro a 660 nm (11.2.2) contra testigo que contenga todos los ingredientes anteriores, excepto la solución de almidón.

La lectura en la escala de absorbancia es el índice de azul.

11.4 *Procedimiento*.

11.4.1 Normalización de la solución de almidón: Calentar la solución de almidón hasta 40 °C y mediante una pipeta, echar 5 mililitros de la misma en 10 mililitros de agua destilada a 40 °C y mezclar bien. Con una pipeta verter 1 mililitro de esta mezcla en 10 mililitros de solución de yodo 0,0007N diluida en 35 mililitros de agua destilada y mezclar bien. Leer la absorbancia a 660 nm (11.2.2) contra testigo de agua. La absorbancia debe ser $0,760 \pm 0,020$. En caso necesario, deberá ajustarse el volumen de agua añadido hasta obtener la absorbancia exacta.

11.4.2 Preparación de la solución de miel: Poner 10,0 gramos de miel que no haya sido previamente calentada, en un vaso de precipitados y disolver en 20 mililitros de agua destilada, añadir 5 mililitros de solución amortiguador de acetato. Una vez disuelta perfectamente y amortiguada la muestra se añaden 3,0 mililitros de cloruro de sodio 0,5 M y trasvasar a un matraz de 50 mililitros y enrasar.

11.4.3 Determinación: Mediante una pipeta, poner 10 mililitros de solución de miel en dos tubos de una capacidad aproximada de 60 mililitros de cada uno y colocarlos en baño María a 40 °C (11.2.1) junto con el matraz que contiene la solución de almidón. Aparte preparar varios recipientes, de capacidad adecuada, con 10 mililitros de solución de yodo 0,0007N (11.3.3) cada uno y el volumen de agua obtenido en la normalización del punto (11.4.1). Transcurrido quince minutos, verter con sendas pipetas, 5 mililitros de agua en un tubo con la solución de miel (blanco) y 5 mililitros de solución de almidón en el otro tubo que contiene solución de miel (problema). Mezclar bien y poner en marcha un cronómetro. Tomar un mililitro de la solución blanco y verterlo en uno de los recipientes que contiene la solución de yodo, éste es el blanco de lectura.

A intervalos de cinco minutos, sacar porciones de 1 mililitro de la solución problema y verterlo en los recipientes preparados anteriormente.

Mezclar bien.

Determinar inmediatamente la absorbancia a 660 nm, en el espectrofotómetro (11.2.2) frente al blanco de lectura. Seguir tomando porciones de 1 mililitro a intervalos conocidos de tiempo hasta lograr una absorbancia menor de 0,235.

La tabla siguiente permite prever, aproximadamente, el tiempo necesario para alcanzar el punto final, en función de la absorbancia medida en la lectura hecha a los cinco minutos de realizar la mezcla.

| Absorbancia (tras cinco minutos de hidrólisis) | Tiempo aproximado (en minutos) |
|--|--------------------------------|
| 0,70 | 30 o más |
| 0,65 | 25-30 |
| 0,60 | 16-20 |
| 0,55 | 13-15 |
| 0,50 | 11-12 |
| 0,45 | 9-10 |
| 0,40 | 8-9 |

11.5 *Cálculos y expresión de los resultados*.—Representar gráficamente la absorbancia en función del tiempo (minutos) sobre papel milimetrado. Ajustar la recta. Determinar el tiempo (t) en que la mezcla alcanza la absorbancia de 0,235.

$$\text{Índice de diastasa (ID)} = \frac{300}{t}$$

Siendo:

t = tiempo en minutos transcurridos.

ID = Índice de diastasas de la escala Gothe = Actividad de la diastasa en mililitros de solución almidón al 1 por 100 hidrolizada por la enzima contenida en 1 gramo de miel, en una hora a 40 °C.

11.6 *Observaciones*.—En aquellas muestras con ID > 35, sólo es necesaria una lectura a los cinco minutos si se toma suficiente-

mente pronto otra muestra que dé una absorbancia aproximada a 0,20. Si se desea obtener resultados más exactos debe repetirse la determinación tomando muestras cada minuto.

En muestras con ID bajo se pueden espaciar las lecturas teniendo en cuenta la tabla de aproximaciones.

El valor obtenido a los cinco minutos no es una buena predicción del ID.

12. Conductividad eléctrica

12.1 *Principio.*-Medida de la conductividad eléctrica de una solución de miel al 20 por 100 de materia seca a 20°C.

12.2 *Material y aparatos.*

12.2.1 Conductímetro.

12.2.2 Baño termostático.

12.3 *Procedimiento.*

Pesar una masa de miel tal que $m = \frac{5 \times 100}{\text{Residuo seco}}$

Disolver la miel en unos mililitros de agua destilada, recientemente hervida y completar hasta 25 mililitros en matraz aforado. Verter esta solución en un vaso de 50 mililitros y ponerlo en un baño termostático a 20°C.

Introducir la celda de medida en la solución de miel hasta que la temperatura sea de 20°C ± 0,5°C. Hacer la lectura.

12.4 *Calibración.*

La calibración del apartado se realiza a la misma temperatura utilizando una solución acuosa de cloruro de potasio, cuya conductividad no difiera más de 500 μ s/cm de la esperada para la muestra problema.

TABLA ORIENTATIVA

Conductividad eléctrica de solución de cloruro de potasio a 20°C

| Concentración. | Conductividad eléctrica S/cm |
|----------------------|------------------------------|
| 10 ⁻⁴ | 13,44 |
| 5 × 10 ⁻⁴ | 66,46 |
| 10 ⁻³ | 132,20 |
| 5 × 10 ⁻³ | 644,80 |
| 10 ⁻² | 1.271,00 |
| 2 × 10 ⁻² | 2.488,00 |
| 5 × 10 ⁻² | 5.996,00 |
| 10 ⁻¹ | 11.660,00 |
| 2 × 10 ⁻¹ | 22.320,00 |

12.5 *Expresión de los resultados.*-La conductividad de la miel se expresará en siemens por cm⁻¹.

13. Sólidos insolubles en aguas

13.1 *Principio.*-Esta determinación se basa en el aumento de peso que experimenta un crisol poroso después de filtrar por él una cantidad conocida de miel disuelta en agua ligeramente alcalinizada.

13.2 *Material y aparatos.*

13.2.1 Crisoles filtrantes de vidrio sinterizado de porosidad 15-40 micras.

13.2.2 pH-metro.

13.2.3 Equipo de filtración a vacío.

13.2.4 Estufa de desecación.

13.2.5 Centrífuga.

13.3 *Reactivos.*

13.3.1 Solución acuosa de hidróxido sódico 0,1N.

13.4 *Procedimiento.*-Pesar con aproximación de 10 miligramos, 20 gramos de miel que no debe haber sido limpiada previamente. Disolverla con unos 50 mililitros de agua destilada o desionizada, introducir en la disolución los electrodos de un pH-metro y añadir solución de NaOH 0,1N (13.3.1) agitando continuamente hasta que el pH esté comprendido entre 8 y 9.

Filtrar la disolución a través de un crisol filtrante (13.2.1), previamente secado y tarado que estará conectado a un dispositivo de filtración a vacío (13.2.3). Transvasar cuantitativamente todo el material sólido al crisol y lavar abundantemente con agua destilada; calentada a 80°C, el residuo que permanece en el crisol.

Algunas mieles como las de brezo obturan con facilidad los poros del filtro impidiendo la filtración. En estos casos se debe centrifugar la disolución alcalinizada a 3.000 revoluciones/minuto

durante diez minutos, decantar el líquido sobrenadante a través del filtro y verter después el sedimento, lavando, finalmente, el crisol con abundante agua caliente.

Secar al crisol filtrante con el residuo lavado durante una hora a 135°C, enfriar en desecador y pesar con aproximación de 0,1 miligramos.

14.5 *Cálculo.*-Los resultados se expresan en porcentaje de sólidos insolubles en agua por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentajes sólidos insolubles en agua} = \frac{(P_1 - P_2) \cdot 100}{P}$$

Siendo:

P₁ = Peso del crisol, en gramos, con el residuo seco.

P₂ = Peso del crisol, en gramos, vacío.

P = Peso, en gramos, de miel.

MINISTERIO DE ECONOMIA Y HACIENDA

15961 REAL DECRETO 1150/1986, de 11 de abril, sobre atribución de funciones de gestión y liquidación en el Impuesto General sobre las Sucesiones.

La disposición adicional sexta de la Ley 10/1985, de 26 de abril, de modificación parcial de la Ley General Tributaria, establece que las competencias que en materia de normativa, gestión y liquidación e inspección del Impuesto General sobre las Sucesiones corresponden al Ministerio de Economía y Hacienda se ejercerán en la forma que reglamentariamente se determine, sin perjuicio de las atribuidas en estas materias a las Comunidades Autónomas.

Dispuesto ya por la disposición transitoria tercera del Real Decreto 850/1985, de 5 de junio, que las competencias atribuidas a la suprimida Dirección General de lo Contencioso del Estado en materia de gestión e inspección del Impuesto General sobre las Sucesiones pasasen a las Direcciones Generales de Tributos y de Inspección Financiera y Tributaria del Ministerio de Economía y Hacienda, se hace preciso ahora, por una parte, completar esta previsión reglamentaria determinando a quién corresponderá ejercitar en el futuro las funciones que en el Impuesto General sobre las Sucesiones estaban atribuidas, en la Administración periférica, a las Abogacías del Estado de las Delegaciones de Hacienda y, por otra parte, adaptar las normas sobre gestión del impuesto a la nueva situación establecida por el Real Decreto 1279/1985, de 24 de julio, por el que se regula el Centro de Gestión y Cooperación Tributaria, al que se atribuyen funciones, en general, de dirección, planificación, coordinación, impulso y control de la gestión de los tributos, sin perjuicio de las funciones expresamente atribuidas a otros Centros directivos del Ministerio de Economía y Hacienda.

En su virtud, a propuesta del Ministerio de Economía y Hacienda, y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 11 de abril de 1986,

DISPONGO:

Artículo 1.º Sin perjuicio de los regímenes tributarios especiales por razón del territorio y de lo dispuesto en las Leyes reguladoras de la cesión de tributos a las Comunidades Autónomas, las funciones que en materia de gestión y liquidación del Impuesto General sobre las sucesiones estaban encomendadas a la Dirección General de lo Contencioso y a las Abogacías del Estado se ejercerán, en la Administración Central, por el Centro de Gestión y Cooperación Tributaria y la Dirección General de Tributos, según sus respectivas competencias, y en la Administración periférica, por los Delegados de Hacienda y las Dependencias de Gestión Tributaria.

Art. 2.º Las Oficinas Liquidadoras de Distrito Hipotecario, a cargo de los Registradores de la Propiedad, seguirán ejerciendo las funciones que tienen atribuidas por la normativa vigente, con las adaptaciones que deriven de lo dispuesto en el artículo anterior. Los expedientes de comprobación de valores que instruyan, de cuantía superior a cinco millones de pesetas, habrán de ser aprobados por el Jefe de la Dependencia de Gestión Tributaria.

Art. 3.º Las competencias atribuidas en el texto refundido del Impuesto General sobre las Sucesiones, aprobado por Decreto 1018/1967, de 6 de abril, a las Abogacías del Estado y al Director General de lo Contencioso del Estado para conceder aplazamiento