

---

**NORMA CUBANA**

**NC**

730: 2012

---

**APICULTURA — MIEL DE ABEJAS — MÉTODOS DE ENSAYO**

Apiculture — Bee honey — Testing methods

---

ICS: 65.140

2. Edición      Octubre 2012  
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.  
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio  
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

**NC 730: 2012**

## **Prefacio**

La Oficina Nacional de Normalización (NC) es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

### **Esta Norma Cubana:**

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización Provisional de Apicultura integrado por representantes de las siguientes entidades:
  - Ministerio de la Agricultura
  - Ministerio del Comercio Interior
  - Centro de Investigaciones Apícolas
  - Laboratorio Cubacontrol
  - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos
  - Asociación Nacional de Agropecuarios Pequeños
  - Instituto de Medicina Veterinaria
  - Centro Nacional de Sanidad Vegetal
  - Grupo Empresarial de Agricultura de Montaña
  - Cubaexport
  - Empresa Comercial de Cuba-Café
  - Comercializadora de Productos Agropecuarios
  - Oficina Nacional de Normalización
- Es concordante con los Métodos Armonizados de la Comisión Europea de Miel, *Apidologie/2002* y del Comité del Codex Alimentarius sobre los Azúcares/2000.
- Sustituye a la Norma Cubana NC 730: 2009 *Apicultura – Miel de abejas – Métodos de ensayo*, la cual ha sido actualizada en lo relacionado con los métodos de ensayo de humedad y color y el informe de ensayo.
- Incluye los Anexos A y B normativos.

**© NC, 2012**

**Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:**

**Oficina Nacional de Normalización (NC)**

**Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.**

**Impreso en Cuba.**

**APICULTURA — MIEL DE ABEJAS — MÉTODOS DE ENSAYO****1 Objeto**

Esta Norma Cubana especifica los métodos de ensayos para el control de la calidad de la miel de abejas.

**2 Referencias normativas**

Los documentos que se mencionan seguidamente son indispensables para la aplicación de esta Norma Cubana. Para las referencias fechadas, solo se toma en consideración la edición citada. Para las no fechadas, se toma en cuenta la última edición del documento de referencia (incluyendo todas las enmiendas).

NC 781:2010 Apicultura — Términos y definiciones.

NC 371:2012 Miel de abejas — Especificaciones.

**3 Términos y definiciones**

A los fines de esta norma se aplican los términos y definiciones establecidos en la NC 781, así como los siguientes:

**3.1 Humedad (contenido de agua):** Valor del índice de refracción de la miel determinado por una tabla estándar de referencia.

**3.2 Conductividad eléctrica de la miel:** Se define como el 20% del peso en una solución acuosa a 20°C, donde el 20% se refiere a la materia seca de la miel. El resultado se expresa en miliSiemens por centímetro ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

**3.3 Hidroximetilfurfural;(HMF):** Proceso natural de deshidratación de los azúcares especialmente la fructosa, favorecido por el descenso del pH y el incremento de la temperatura, es un parámetro que evalúa el desarrollo del proceso tecnológico de almacenamiento y tratamiento térmico por lo que se considera un indicador de frescura y de sobrecalentamiento de la miel de abejas.

**4 Métodos de ensayo**

Los métodos de ensayos contenidos en esta norma son los siguientes:

- 4.1 Determinación de humedad. Método refractométrico
- 4.2 Determinación de la conductividad eléctrica
- 4.3 Determinación del color
- 4.4 Determinación de la acidez de tipo libre en la miel de abejas.
- 4.5 Determinación del contenido de de Hidroximetilfurfural en la miel. Método de White
- 4.6 Determinación del índice de diastasa en la miel de abejas. Método de Schade
- 4.7 Determinación de los sólidos insolubles en agua en la miel de abejas.
- 4.8 Determinación de azúcares por HPLC
- 4.9 Determinación del contenido aparente de azúcares reductores.

#### 4.1 Determinación de humedad. Método refractométrico

##### 4.1.1 Principio

El método está basado en el principio de que el índice de refracción aumenta con el contenido de sólidos.

##### 4.1.2 Reactivos y materiales

Agua destilada.  
Frascos con tapas de 50 ml  
Agitador de vidrio o espátula  
Papel absorbente

##### 4.1.3 Aparatos

- Baño de agua termostatado.
- Refractómetro ABBE o digital termostatado a 20 °C.

##### 4.1.4 Procedimiento

###### 4.1.4.1 Operaciones preliminares

Calibrar el refractómetro ABBE a 20 °C en agua destilada

###### 4.1.4.2 Disolución (para mieles cristalizadas)

Homogenizar la muestra y colocar en un frasco tapado.  
Colocar en un baño de María a 50 °C ( $\pm 0,2$ ) hasta que los cristales de azúcar estén disueltos.  
Enfriar la solución a temperatura ambiente y agitar nuevamente.

###### 4.1.4.3 Determinación

Asegurarse de que el prisma del refractómetro esté limpio y seco.

Después de homogenizar la muestra, cubrir la superficie del prisma con la misma.

Después de 2 minutos, leer el índice de refracción.

Medir cada muestra 2 veces y tomar el valor promedio.

Leer el contenido de humedad correspondiente en la Tabla A.1 (Anexo A), si la temperatura es diferente a 20 °C, corregir la lectura según 4.1.5.

Limpiar cuidadosamente el prisma luego del uso.

##### 4.1.5 Cálculos

Si la determinación se realiza a una temperatura superior a 20 °C sumar 0,00023 al índice de refracción determinado por cada grado por encima de 20 °C. Si la determinación se realiza a una temperatura inferior a 20 °C restar 0,00023 al índice de refracción determinado por cada grado por debajo de 20 °C.

Una vez realizada la corrección convertir la lectura de índice de refracción en humedad utilizando la Tabla A.1 (Anexo A) nuevamente.

El resultado se expresa en el informe de ensayo. (Ver Anexo B)

#### **4.1.6 Criterios de aceptación**

El contenido de humedad se expresa en % y su límite de aceptación establecido oscila entre 14 % -20 % para mieles de origen floral y < 21 % en mieles de rocío.

### **4.2 Determinación de la conductividad eléctrica**

#### **4.2.1 Principio**

Se basa en la medición de la resistencia eléctrica, el recíproco de este valor es la conductividad eléctrica. Este método está basado en el trabajo original de Vor woh/ (Ref. 1 pág. 17- IHC)[9]

#### **4.2.2 Aparatos**

- Refractómetro
- Balanza Analítica.
- Conductímetro.
- Baño de agua termostataado.

#### **4.2.3 Reactivos y materiales**

- Espátula.
- Beaker de 150 ml.
- Volumétrico de 100 ml.
- Agitador de vidrio.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.
- Etanol.

#### **4.2.4 Procedimiento**

##### **4.2.4.1 Operaciones preliminares**

Determinar el % de humedad de la miel a analizar.

Encender el baño de agua refrigerado media hora antes de comenzar la determinación (regular la temperatura aproximadamente a 20 °C).

Encender el conductímetro media antes de comenzar la determinación.

#### 4.2.4.2 Preparación de la muestra de ensayo

- Homogenizar bien el frasco que contiene la miel a analizar.
- Pesar 20,00 g (base seca) de miel.
- Disolver en aproximadamente 75 ml de agua recién destilada (fresca).
- Trasvasar a volumétrico de 100 ml y completar el volumen con agua.
- Colocar el volumétrico en el baño de agua refrigerado regulado aproximadamente a 20°C.
- Esperar alrededor de media hora hasta que la muestra alcance la temperatura deseada.
- Extraer el volumétrico del baño y trasvasar la solución a un beaker de 150 ml.
- Introducir el electrodo del conductímetro en la solución y esperar que se alcance la temperatura de 20 ° C.
- Realizar la lectura de la conductancia a 20 °C y el valor de K.

#### 4.2.5 Cálculos

$$CE = K \times G.$$

donde

CE: Conductividad eléctrica a 20 ° C expresada en microSiemens por centímetro [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]

K: Constante de celda.

G: Conductancia a 20 ° C expresada en microSiemens por centímetro [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ].

NOTA El resultado se reporta en miliSiemens por centímetro [ $\text{mS}/\text{cm}$ ]. Hacer la conversión dividiendo el resultado por 1000.

#### 4.2.6 Criterios de aceptación

Esta determinación se expresa en miliSiemens por centímetro [ $\text{mS}/\text{cm}$ ].

La NC 371: 2012 establece como límite máximo aceptable 0,8 mS/cm.

### 4.3 Determinación del color

#### 4.3.1 Principio:

Este método se basa en la medición del color de la muestra de miel mediante colorímetros Pfund.

#### 4.3.2 Aparatos

- Analizador de color para mieles. Amplitud de la escala: 0-150 mm.

#### 4.3.3 Materiales y reactivos

- Papel absorbente
- Glicerol
- Cubetas ópticas cuadradas ajustadas a un paso de luz de 10 mm

#### 4.3.4 Procedimiento

Llenar una cubeta con el glicerol para realizar la calibración del equipo  
 Añadir a una segunda cubeta la muestra de miel de abejas  
 Leer directamente en el equipo el valor de la intensidad del color de la miel

Los resultados se expresan en mm de la escala Pfund y por este valor las mieles se clasifican de acuerdo al color en Grados de Calidad, mediante la Tabla 1 de la presente Norma.

NOTA Comprobar siempre la transparencia y limpieza de las cubetas antes de ser utilizadas y que tanto el patrón como las muestras a leer no tengan burbujas de aire

#### 4.3.5 Repetibilidad

Estas lecturas deben hacerse por triplicado.

**Tabla 1 — Clasificación de la miel según su color en la escala Pfund**

Grado de Calidad	Denominación	Color (mm) Escala de Pfund
A	(WW) Blanco agua	Desde 0 hasta 8
B	(EW) Extra blanco	Desde 9 hasta 16
C	(W) Blanco	Desde 17 hasta 34
D	(ELA) Ámbar extra claro	Desde 35 hasta 50
E	(LA) Ámbar claro	Desde 51 hasta 85
F	(A) Ámbar	Desde 86 hasta 114
G	(D) Oscuro	≥ 114

#### 4.4 Determinación de la acidez de tipo libre en la miel de abejas

##### 4.4.1 Principio

Se basa en la neutralización de los ácidos libres contenidos en un volumen determinado de muestra, utilizando el pHmetro hasta alcanzar el punto de equivalencia (8,30)

##### 4.4.2 Aparatos

- Agitador magnético.
- Balanza Analítica. Marca Cobos.

##### 4.4.3 Materiales y reactivos

- Bureta de 25 ml
- Beaker de boca ancha de 250 ml
- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N (Fixanal)
- Fenolftaleína indicador.
- Agua destilada

#### 4.4.4 Procedimiento

##### 4.4.4.1 Operaciones preliminares

Calibre el pHmetro a pH 3,0; 7,0 y 9,0.

Preparar una solución de hidróxido de sodio 0,1 N.

Poner a hervir agua destilada para eliminar el dióxido de carbono y a continuación dejarla enfriar a temperatura ambiente.

##### 4.4.4.2 Preparación de la muestra de ensayo

Homogenizar bien el frasco que contiene la miel a analizar.

Pesar 10,0 g de miel.

Disolver en 75 ml de agua destilada libre de carbonatos.

##### 4.4.4.3 Titulación

Introducir el electrodo en la solución de la muestra.

Valorar la muestra con la solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta alcanzar el valor de pH 8,30

Anotar los ml de de la solución de hidróxido de sodio consumidos en la valoración.

##### 4.4.6 Cálculos

El índice de acidez se expresa en meq / kg.

$$A = \frac{100 \cdot V}{M} \text{ meq / kg}$$

donde

A: Índice de acidez (meq / kg.)

V: Volumen de solución hidróxido de sodio consumido en la valoración (ml)

M: Masa de la muestra de ensayo.

##### 4.4.7 Criterios de aceptación

El índice de acidez se expresa en meq / kg

La NC 371: 2012 establece como aceptable un índice de acidez de 50 meq / kg como máximo.

NOTA Este análisis se realiza por duplicado.

#### 4.5 Determinación del contenido de de Hidroximetilfurfural en la miel. Método de White

##### 4.5.1 Principio

La determinación del Hidroximetilfurfural está basada en la determinación de UV de la absorbancia a 248 nm, se establece la diferencia de las absorbancias entre la solución acuosa de la muestra y esta solución con adición de bisulfito. Este método se basa en el trabajo original de White.



#### 4.5.2 Aparatos

- Balanza analítica.
- Agitador magnético con calefacción.
- Espectrofotómetro UV-visible. Computadora acoplada.

#### 4.5.3 Materiales y reactivos

- Beakers de 25 ml y 50 ml.
- Espátula.
- Agitador de vidrio.
- Volumétricos de 50 ml y 100 ml.
- Embudos de cristal.
- Papel de filtración rápida.
- Pipetas de 5 ml y 1 ml.
- Gradillas.
- Tubos de ensayo.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm.
- Hexacianoferrato (II) de potasio. (Para solución Carrez I).
- Acetato de zinc dihidratado (Para solución Carrez II).
- Bisulfito de sodio.
- Agua destilada.

#### 4.5.4 Procedimiento

##### 4.5.4.1 Operaciones preliminares

Preparar las soluciones Carrez I, II y la solución de Bisulfito de sodio

Homogenizar bien el frasco que contiene la miel a analizar.

Pesar 5 g de miel en un beaker de 25 ml.

Encender la computadora, ir al programa Visión 32 y abrir el fichero HMF.

Encender el espectrofotómetro.

##### 4.5.4.2 Preparación de la muestra de ensayo y la referencia

- Disolver 5 g de miel en 25 ml de agua destilada y pasarlos a un volumétrico de 50 ml.
- Añadir 1 ml de la solución Carrez I e inmediatamente 1 ml de la solución Carrez II.
- Mezclar y enrasar con agua destilada.
- Agitar vigorosamente.
- Dejar en reposo durante 3 minutos aproximadamente y filtrar con papel de filtración rápida.
- Desechar los primeros 10 ml del filtrado en el mismo beaker que se utilizó para pesar.
- Recoger el resto del filtrado en un beaker limpio de 50 ml.
- Pipetear 5 ml del filtrado en 2 tubos de ensayos y añadir 5 ml de agua destilada a cada uno (solución muestra). Mezclar bien.
- Pipetear 5 ml del filtrado a otro tubo de ensayos y añadir 5 ml de la solución de bisulfito de sodio (solución referencia). Mezclar bien.

#### 4.5.4.3 Determinación

- Ajustar el cero del espectrofotómetro añadiendo a las dos cubetas la solución de referencia. (El cero se ajusta para cada lote)
- Una vez ajustado el cero, desechar la solución de referencia de la cubeta de muestra, enjuagar bien la cubeta con agua destilada y añadir la solución muestra.
- Determinar la absorbancia de la muestra frente a la referencia a 284 nm y 336 nm.

NOTA Si la diferencia entre las absorbancias es superior a 0,6, diluir la solución muestra con agua y la solución de referencia con solución de bisulfito de sodio, previamente diluida (1:1) con agua destilada, en la misma proporción. Leer nuevamente las absorbancias.

#### 4.5.5 Cálculos

Calcular el valor de HMF por la siguiente fórmula:

$$\text{HMF} = [ (A_1 - A_2) * f * 5 ] * D / P$$

donde

A<sub>1</sub>: Absorbancia a 284 nm.

A<sub>2</sub>: Absorbancia a 336 nm.

f = 149,7: Factor para expresar el resultado en mg / kg.

5: Peso teórico nominal de la muestra.

D: factor de dilución en caso de ser necesaria una dilución.

P: peso de la muestra.

Computadora: Ir al programa cálculos y abrir el file HMF. Introducir los datos de peso de muestra y las absorbancia a las dos longitudes de onda. La máquina dará el valor de HMF calculado.

#### 4.5.6 Criterios de aceptación

- Los resultados se expresan en mg de HMF /1000 g de miel.
- La NC 371: 2012 establece como límite de aceptación 40 mg / kg como máximo.

### 4.6 Determinación del índice de diastasa en la miel de abejas. Método de Schade

#### 4.6.1 Principio

Se basa en la determinación de la enzima diastasa, a través de un análisis espectrofotométrico.

#### 4.6.2 Aparatos

- Espectrofotómetro UV/Vis. Computadora acoplada.
- Baño termostataado.
- Balanza analítica.
- Plancha de calentamiento con agitación magnética.
- pHmetro.

- Cronómetro.

#### 4.6.3 Materiales y reactivos

- Beakers de 50 ml, 100 ml y 150 ml
- Volumétrico de 50 ml, 100 ml y 500 ml
- Pipetas de 1ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml
- Agitadores de vidrio.
- Balones de fondo plano (100 ml)
- Probetas de 50 ml y 100 ml
- Tubos de ensayos de 25 ml
- Solución madre de yodo.
- Yoduro de potasio (p.a.)
- Solución reguladora de pH 5,3
- Solución de cloruro de sodio 0,5 M
- Almidón soluble calibrado.

#### 4.6.4 Procedimiento

##### 4.6.4.1 Operaciones preliminares

- Preparar solución diluida de yodo.
- Ajustar la solución de almidón
- Colocar dicha solución en baño de agua a 40 °C.
- Verter con una pipeta 5 ml de la solución de almidón a 40 °C en un tubo de ensayos que contiene 10 ml de agua a 40°C y mezclar con agitador de vidrio hasta completa homogenización. Esperar 15 minutos.
- Tomar 1 ml de esta solución y verterlo en un balón de fondo plano que contenga 30 ml de agua y 10 ml de solución diluida de yodo. Mezclar bien.
- Leer la absorbancia de la solución de almidón a 660nm en el espectrofotómetro contra blanco agua. La absorbancia debe ser  $0.76 \pm 0.02$ .
- De no ser así, ajustar el volumen de agua añadido hasta obtener el valor de absorbancia requerida.

##### 4.6.4.2 Preparación de la muestra de ensayo

- Homogenizar bien el frasco que contiene la miel a analizar.
- Pesar 5,00 g de miel en beaker de 100 ml.
- Disolver con 18,5 ml de agua destilada.
- Añadir 2,5 ml de solución reguladora de pH 5,3. Homogenizar.
- Añadir 1,5 ml de solución de cloruro de sodio 0,5 M. Homogenizar.

##### 4.6.4.3 Determinación

- Tomar con una pipeta 10 ml de la muestra de anterior y verterlos en un tubo de ensayos.
- Colocar el tubo en baño de agua a  $40 \text{ °C} \pm 0,02 \text{ °C}$ . Esperar 15 minutos.
- Transcurrido este tiempo, verter con una pipeta 5 ml de la solución de almidón en el tubo que contiene la muestra. Mezclar hasta completa disolución. Esperar 4 minutos.

- Al cabo de los 4 minutos, extraer 1 ml de esta mezcla y verterlos en el balón que contiene 10 ml de solución diluida de yodo.
- Realizar esta operación cada 4 minutos para obtener cuatro puntos y leer inmediatamente la absorbancia de cada solución yodo-almidón.

#### 4.6.5 Cálculos

Ir al programa “Qbrecta” e introducir los datos obtenidos. Con este programa se obtendrá el valor del tiempo en que la absorbancia es 0,235.

Ir al programa “Cálculos” y abrir el file “Diastasa”. Introducir este tiempo y la computadora dará el valor del índice de diastasa.

Anotar los resultados.

#### 4.6.7 Criterios de aceptación

La actividad diastásica se expresa como unidades en la escala Schade. La NC 371: 2012 establece como límite de aceptación 8.U como mínimo.

### 4.7 Determinación de los sólidos insolubles en agua en la miel de abejas

#### 4.7.1 Principio

Se basa en la determinación gravimétrica de los sólidos insolubles en agua presentes en la muestra.

#### 4.7.2 Aparatos

- Balanza analítica.
- Bomba de vacío.
- Estufa con calentamiento hasta 200 ° C.

#### 4.7.3 Materiales y reactivos

- Espátula.
- Beaker de de 50 ml 150 ml, y 1000 ml.
- Volumétrico de 100 ml
- Pipeta de 2 ml
- Agitador de vidrio.
- Crisol de vidrio sintetizado No. 3.
- Kitasato
- Junta de Goma.
- Acido sulfúrico concentrado ( p.a).
- Agua destilada.
- Dicromato de potasio.

#### 4.7.4 Procedimiento

##### 4.7.4.1 Operaciones preliminares

Calentar a 80 °C alrededor de 200 ml de agua destilada por muestra a analizar.

Regular la estufa a 135 °C.

Tarar el crisol de vidrio sinterizado después de haberle aplicado tratamiento térmico a 135 °C (60-90 minutos) y posterior enfriamiento en desecadora.

##### 4.7.4.2 Preparación de la muestra de ensayo

Pesar 20 g de miel ( $\pm 0,01$  g).

Conectar el kitasato a la bomba de vacío.

Colocar la junta de goma y el crisol sinterizado en el kitasato.

Disolver la miel en aproximadamente 75 ml de agua destilada a 80 °C.

Filtrar la miel disuelta mediante aplicación de vacío.

Lavar sucesivamente con porciones de 25 ml-30 ml de agua a 80 °C hasta volumen total de 200 ml.

Colocar el crisol sinterizado en la estufa a 135 °C (60-90 minutos).

Realizar la pesada hasta peso constante con precisión de 0,1 mg.

##### 4.7.5 Cálculos

% Sol. Ins. =  $100 \times (P-T) / M$ .

donde

% Sol. Ins: Porcentaje de sólidos insolubles en miel.

P: Masa del crisol y los sólidos insolubles en agua.

T: Masa del crisol.

M: Masa de miel

##### 4.7.6 Criterios de aceptación

Esta determinación se expresa gramos de residuos insolubles por cien gramos de miel (%).

La NC 371: 2012 establece como límite máximo aceptable hasta 0,1 g/100 g.

#### 4.8 Determinación de azúcares por HPLC

##### 4.8.1 Principio

Está basado en el método publicado originalmente por Bogdanov y Baumann [1]. Después de filtrada la solución, el contenido de azúcar es determinado por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión) con detección del índice de refracción (IR). Los picos son identificados basándose en sus tiempos de retención. La cuantificación está basada de acuerdo al método de estándar externo sobre el área o altura de los pico

##### 4.8.2 Reactivos

Deben ser usados con grado de pureza química y analítica.

- El agua debe ser de calidad HPLC.

- Metanol grado HPLC.
- Acetonitrilo grado HPLC.

**Precaución:** El acetonitrilo es una sustancia peligrosa. Deben consultarse las normas de seguridad y sustancias peligrosas del laboratorio.

#### 4.8.3 Fase móvil para el HPLC

Mezclar 80 ml de Acetonitrilo con 20 ml de agua. Desgasificar antes de ser usado.

#### 4.8.4 Solución estándar de azúcares

En un volumétrico de 100 ml introducir 25 ml de Metanol. Dependiendo de los azúcares que serán analizados, disolver en aproximadamente 40 ml de agua las cantidades mostradas a continuación, transferir cuantitativamente al volumétrico y enrasar con agua.

- Fructosa: 2,000 g
- Glucosa: 1,500 g
- Sacarosa: 0,250 g
- Turanosa: 0,150 g
- Maltosa: 0,150 g

Usar jeringuilla y filtro de membrana pre-montado para transferir la solución hacia los viales de muestra.

Las soluciones estándares son estables por 4 semanas en refrigeración a 4 °C y por 6 meses a 18 °C.

#### 4.8.5 Aparatos

- Viales de muestra.
- Baño ultrasónico.
- Volumétrico de 100 ml
- Pipeta de 25 ml
- Filtro de Membrana para solución acuosa, tamaño de poro 0,45 µm.
- Jeringuilla para montar el filtro de membrana.
- HPLC provisto de bomba, inyector de muestra, detector IR regulado a 30 °C, horno de columna regulado a 30 °C y computadora.
- Columna analítica de acero inoxidable con 4.6mm de diámetro interno, 250 mm de longitud, rellena de silicagel modificado con NH<sub>2</sub> y con tamaño de partícula de 5 µm - 7 µm.

NOTA El análisis cromatográfico de los diferentes azúcares puede llevarse a cabo a temperatura ambiente sin influir en los resultados, sin embargo, no es posible la separación de la erlosa y la melizitosa.

#### 4.8.6 Procedimiento

##### 4.8.6.1 Preparación de la solución de la muestra de ensayo

Se pesan 5 g de miel en un beaker y se disuelven en 40 ml de agua. Pipetear, en un volumétrico de 100 ml, 25 ml de metanol y transferir al mismo, cuantitativamente, la solución de la miel, anteriormente preparada. Enrasar con agua. Verter a través de un filtro de membrana a un vial. Almacenar en iguales condiciones que la solución estándar.

##### 4.8.6.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Si se utiliza una columna como la descrita anteriormente, las siguientes condiciones son las utilizadas para logra una buena separación:

- Velocidad de flujo: 1,3 ml/min.
- Fase Móvil: Acetonitrilo: Agua (80:20, v/v).
- Temperatura de columna y detector: 30°C.
- Volumen de muestra: 10 µL.

NOTA Si no es posible llevar el análisis a 30 °C y si el detector no puede ser termostatado a 30 °C, llevar a cabo el análisis a temperatura ambiente. En este caso no es posible la separación de la erlosa y la melizitosa. Debe inyectarse el mismo volumen de solución estándar y de muestra.

#### 4.8.7 Cálculos y expresión de los resultados

Los azúcares en la miel son identificados y cuantificados por comparación de los tiempos de retención y las áreas de los picos de los azúcares que componen la solución estándar.

El porcentaje en masa de los azúcares, W, está determinado como fructosa, glucosa, etc. y maltosa g/100g de miel y se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula (estándar externo):

$$W = A_1 \times V_1 \times m_1 \times 100 / A_2 \times V_2 \times m_0$$

donde

$A_1$  = Área o altura del pico del compuesto de azúcar presente en la solución de la muestra de ensayo, expresada como unidad de área, longitud o integración.

$A_2$  = Área o altura del pico del compuesto de azúcar presente en la solución estándar, expresada como unidad de área, longitud o integración.

$V_1$  = Volumen total de la solución de la muestra de ensayo expresada en ml

$V_2$  = Volumen total de la solución estándar expresada en ml

$m_1$  = Cantidad en masa de los azúcares expresada en gramos en el volumen total de la solución estándar ( $V_2$ )

$m_0$  = Peso de la muestra expresada en gramos.

NOTA El resultado, se redondea a dos lugares después de la coma.

## 4.9 Determinación del contenido aparente de azúcares reductores

### 4.9.1 Principio

Este método es una modificación del método de Lane y Eynon, 1923 y consiste en reducir la solución Fehling modificada por Soxhlet, titulándola a la temperatura de ebullición con una solución de los azúcares reductores de la miel, empleando azul de metileno como indicador.

### 4.9.2 Materiales y reactivos

- Volumétrico de 1 L, 250 ml y 100 ml.
- Beakers de 250 ml, 150 ml, 100 ml y 50 ml
- Pipetas graduadas de 10 ml y 5 ml.
- Pipetas aforadas de 50 ml
- Goteros de 1 ml
- Sulfato de cobre pentahidratado.
- Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado.
- Azul de metileno.
- Crema de alúmina.
- Sacarosa pura para análisis.
- Acido clorhídrico al 36,5 %.
- Cloruro de bario.
- Agua destilada.

### 4.9.3 Aparatos

- Plancha de agitación y calentamiento.
- Phmetro
- Balanza Analítica
- Agitador magnético

### 4.9.4 Procedimiento

#### 4.9.4.1 Preparación de las soluciones

##### 4.9.4.1.1 Solución de Fehling modificada por Soxhlet

**Solución A:** Se disuelven 69,28 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en agua hasta obtener 1 L de solución. Esta solución se prepara con 24 horas de antelación para efectuar la titulación.

**Solución B:** Se disuelven 346 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) y 100 g de hidróxido de sodio (NaOH) en agua hasta obtener 1 L de solución, la cual se filtra por un crisol preparado con asbesto.



#### 4.9.4.1.2 Solución patrón de azúcar invertido (10 g/L)

Se pesan 9,5 g de sacarosa pura, desecada y conservada con anterioridad en una desecadora con agente desecante apropiado, se le añaden 5 ml de ácido clorhídrico puro (HCL al 36,5 %) y se disuelve en agua hasta obtener 100 ml. Esta solución se conserva durante 3 días de 20 a 25 °C y se diluye hasta volumen de 1L.

#### 4.9.4.1.3 Solución diluida de azúcar invertido (2 g/L)

Se neutraliza un volumen de 20 ml de la solución patrón de azúcar invertido, con hidróxido de sodio 1 N (40 g/L) inmediatamente antes de emplearla, diluyéndose en volumétrico de 100 ml; obteniéndose así la concentración necesaria (2 g/L) para el ajuste.

#### 4.9.4.1.4 Solución de azul de metileno

Se disuelven 0,2 g de azul de metileno en agua y se diluye hasta obtener 100 ml

#### 4.9.4.1.5 Crema de alúmina

Se prepara una solución saturada y fría de alumbre ( $K_2SO_4 \cdot Al_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O$ ) en agua, se añade hidróxido de amonio, agitándose hasta obtener una solución alcalina que reaccione al tornasol. Se deja que el precipitado sedimento se lava por decantación hasta que el agua de lavado muestre solo ligeros indicios de sulfatos al ser ensayada con solución de cloruro de bario. El agua sobrante se desecha y la crema de alúmina obtenida se conserva en un frasco de cierre hermético.

#### 4.9.4.2 Preparación de la solución de la muestra de ensayo. Para mieles con sedimentos

Se pesan 25 g de miel homogenizada y se colocan en un volumétrico de 100 ml, se añade 5 ml de crema alúmina y se disuelve con agua a 20 °C hasta volumen y se filtra. Se diluyen 10 ml de esta solución en agua hasta completar 500 ml

Para mieles sin sedimentos:

Se pesan 2 g de la muestra de miel ya homogenizada y se disuelven en agua destilada hasta 250 ml. Se diluyen 50 ml de esta solución en agua hasta obtener 100 ml.

#### 4.9.4.3 Titulación preliminar

Se vierten con una pipeta 5 ml de la solución A en un beaker de 250 ml y se añaden 5 ml de la solución B. Se agregan 7 ml de agua y un agitador magnético. Con una bureta se añaden 13 ml de la solución diluida de miel y se calienta en la plancha de agitación y calentamiento hasta ebullición moderada durante 2 minutos. Se añade 0,5 ml de la solución de azul de metileno, sin interrumpir la ebullición y se completa la valoración con pequeñas adiciones de la solución diluida de miel hasta que el indicador cambie de azul intenso a rojo, cuidar que el tiempo de valoración no exceda 1 minuto, se anota el volumen total de la solución diluida de miel gastada.

Al final de la titulación de reducción, el volumen total de los reactivos añadidos será de 35 ml. Esto se consigue añadiendo el volumen adecuado de agua antes de comenzar la titulación ya que la miel deberá contener más del 65 % de azúcares reductores, es necesaria la titulación preliminar para determinar el volumen de agua que será necesario añadir a una muestra dada para que la

reducción se realice a volumen constante. Para calcular el volumen de agua que es preciso añadir, se resta de 25 ml el volumen de solución diluida de miel, que se ha consumido en la titulación preliminar.

#### 4.9.4.4 Determinación

Se adiciona el volumen de agua estimado en la titulación preliminar teniendo en cuenta que el volumen total de reactivos sea 35 ml Se añade respectivamente 5 ml de solución A y B.

Se añade el agitador magnético y con una bureta 13 ml de la solución de miel diluida. La mezcla se deja ebullición por 2 minutos se añade 0,5 ml de la solución de azul de metileno sin interrumpir la ebullición y se completa la valoración en un minuto con pequeñas adiciones repetidas de solución diluida de miel, hasta que el indicador cambie de color. Se toma nota del volumen total de solución diluida de miel.

#### 4.9.5 Cálculo y expresión de los resultados

El por ciento % de azúcar invertido se calcula por la formula siguiente:

$$AI = \left( \frac{1000}{V} \right) \cdot \left( \frac{F}{PM} \right) \quad (\%)$$

donde

AI: Por ciento de azúcar invertido (%)

V: volumen de la solución diluida de miel empleada en la determinación (ml)

P: masa de la muestra (g)

F: masa nominal para mieles (con sedimento o sin sedimento) (g)

#### 4.10 Determinación del contenido aparente de sacarosa

##### 4.10.1 Principio

Esta basado en el método de inversión de Walker, 1917.

##### 4.10.2 Materiales y reactivos

- Volumétrico de 1L, 250 ml y 100 ml
- Beakers de 250 ml, 150 ml, 100 ml y 50 ml
- Pipetas graduadas de 10 ml y 5 ml
- Pipetas aforadas de 50 ml y 25 ml
- Goteros de 3 ml y 1 ml
- Sulfato de cobre pentahidratado.
- Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado.
- Hidróxido de sodio.
- Acido clorhídrico al 36.5 %
- Azul de metileno.

- Crema de alúmina.
- Sacarosa pura para análisis.
- Cloruro de bario.
- Soluciones buffer de pH 4,0 y 7,0.
- Agua destilada.

#### **4.10.3 Aparatos**

- Plancha de agitación y calentamiento.
- Phmetro
- Baño termostataado
- Balanza Analítica
- Agitador magnético

#### **4.10.4 Procedimiento**

##### **4.10.4.1 Preparación de las soluciones**

###### **4.10.4.1.1 Solución de Fehling modificada por Soxhlet ver 4.9.4.1.1**

###### **4.10.4.1.2 Solución patrón de azúcar invertido (10 g/L) ver 4.9.4.1.2**

###### **4.10.4.1.3 Solución diluida de azúcar invertido (2 g/L) ver 4.9.4.1.3.**

###### **4.10.4.1.4 Solución de azul de metileno ver 4.9.4.1.4**

###### **4.10.4.1.5 Crema de alúmina ver 4.9.4.1.5**

###### **4.10.4.1.5 Acido clorhídrico al 36,5%. (6.34N)**

###### **4.10.4.1.6 Hidróxido de sodio. (5N)**

##### **4.10.4.2 Preparación de la solución de la muestra de ensayo**

Se prepara una muestra de miel según lo que se establece en el apartado 4.9.4.2 según sea el caso.

##### **4.10.4.3 Hidrólisis de la muestra de ensayo**

Se vierten de la solución de miel en un volumétrico de 100 ml con 25 ml de agua; se calienta la muestra de ensayo hasta una temperatura de 65 °C en un baño de agua. A continuación se retira el volumétrico y se añaden 10 ml de ácido clorhídrico 6,34 N. Se deja que la solución se enfríe de modo natural durante 15 minutos y seguidamente se calienta hasta 20 °C y se neutraliza con hidróxido de sodio 5 N, empleando tornasol como indicador. Se enfría de nuevo y se completa hasta volumen de 100 ml

#### 4.10.4.4 Titulación preliminar ver 4.9.4.3

#### 4.10.4.5 Determinación ver 4.9.4.4

#### 4.10.5 Cálculo y expresión de los resultados

El por ciento de azúcar invertido después de la inversión se calcula utilizando la fórmula que establece el apartado 4.9.5 para obtener el por ciento de azúcar invertido antes de la inversión. El por ciento % de sacarosa aparente se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$SA = 0,95 \cdot (d - a) (\%)$$

donde

SA → por ciento de sacarosa aparente (%).

d → contenido de azúcar invertido después de la inversión (mg).

a → contenido de azúcar invertido antes de la inversión (mg).

El resultado se expresa en el informe de ensayo. (Ver anexo A)

### 4.11 Determinación de prolina

#### 4.11.1 Principio

El contenido de prolina es determinado por la proporción. Este método está basado en el método original de Ough<sup>(1)</sup>.

#### 4.11.2 Materiales y reactivos

Deben ser usados de pureza química y analítica.

- Agua destilada
- Acido fórmico (H.COOH) de 98 % hasta 100 %.
- Solución de ninhidrina en 2-metoxietanol al 3 %.
- El 2-propanol al 50 %.
- Solución estándar de prolina: Se prepara a partir de 40 mg / 50 ml se diluye 1 ml de la misma en 25 ml de agua, donde la solución contendrá 0.8 mg / 25 ml
- Volumétricos de 100 ml
- Cubetas de 1 cm.
- Tubos con tapa de rosca de capacidad de 20 ml

#### 4.9.3 Aparatos

- Espectrofotómetro, rango de medición de 500 nm a 520 nm.
- Baño de agua.

#### 4.11.4 Procedimiento

##### 4.11.4.1 Preparación de la muestra de ensayo

Pesar 5 g de miel en un beaker  
Disolver en 50 ml de agua destilada.  
Transferir cuantitativamente a un volumétrico de 100 ml  
Enrasar y agitar bien.

##### 4.11.4.2 Determinación

El coeficiente de extinción no es constante. Sin embargo, para cada serie de mediciones el promedio del coeficiente de extinción de la solución estándar de prolina debe ser determinado por triplicado. Se pipetea 0,5 ml de la solución de la muestra de ensayo en un tubo, 0,5 ml de agua dentro de un segundo tubo y 0,5 ml de solución estándar de prolina dentro de un tercer tubo. Adicionar 1 ml de ácido fórmico y 1 ml de solución de ninhidrina a cada tubo. Cerrar los tubos cuidadosamente y agitar vigorosamente por 15 minutos. Colocarlos en un baño de agua a ebullición durante 15 minutos. Los tubos deben estar sumergidos en el baño de agua de manera que la solución quede por debajo del nivel del baño de agua. Poner el baño de agua a 70 °C y dejar los tubos sumergidos por 10 minutos. Adicionar 5 ml de la solución de 2-propanol a cada tubo y cerrar inmediatamente. Dejarlos enfriar y determinar la absorbancia 45 minutos después de sacarlos del baño de agua a 70 °C en el máximo cercano a 510 nm usando cubetas de 1 cm.

##### 4.11.5 Cálculos y expresión de los resultados

La prolina expresada en mg/kg de miel es calculada según la siguiente ecuación:

$$\text{Prolina (mg/kg)} = \frac{E_s}{E_a} \times \frac{E_1}{E_2} \times 80$$

donde

$E_s$  = Absorbancia de la solución muestra.

$E_a$  = Absorbancia de la solución estándar de prolina (promedio de dos lecturas)

$E_1$  = mg de prolina tomados de la solución estándar.

$E_2$  = Peso de la muestra expresada en gramos.

80 = Factor de dilución.

NOTA El resultado, se redondea a dos lugares decimales.

**Anexo A**  
(normativo)

**Tabla A.1 — Relación entre el contenido de agua en las mieles y el índice de refracción**

Contenido de agua g/100 g	Índice de refracción 20 °C	Contenido de agua g/100 g	Índice de refracción 20 °C
13,0	1,5044	19,0	1,4890
13,2	1,5038	19,2	1,4885
13,4	1,5033	19,4	1,4880
13,6	1,5028	19,6	1,4875
13,8	1,5023	19,8	1,4870
14,0	1,5018	20,0	1,4865
14,2	1,5012	20,2	1,4860
14,4	1,5007	20,4	1,4855
14,6	1,5002	20,6	1,4850
14,8	1,4997	20,8	1,4845
15,0	1,4992	21,0	1,4840
15,2	1,4987	21,2	1,4835
15,4	1,4982	21,4	1,4830
15,6	1,4976	21,6	1,4825
15,8	1,4971	21,8	1,4820
16,0	1,4966	22,0	1,4815
16,2	1,4961	22,2	1,4810
16,4	1,4956	22,4	1,4805
16,6	1,4951	22,6	1,4800
16,8	1,4946	22,8	1,4795
17,0	1,4940	23,0	1,4790
17,2	1,4935	23,2	1,4785
17,4	1,4930	23,4	1,4780
17,6	1,4925	23,6	1,4775
17,8	1,4920	23,8	1,4770
18,0	1,4915	24,0	1,4765
18,2	1,4910	24,2	1,4760
18,4	1,4905	24,4	1,4755
18,6	1,4900	24,6	1,4750
18,8	1,4895	24,8	1,4745
		25,0	1,4740

NOTA Cuando el índice de refracción leído resulta de un valor intermedio se seleccionará el valor más próximo en la Tabla A.1.

**Anexo B**  
(normativo)

**Informe de ensayo**

Test report

Nombre del producto: Product name:		Fecha de Recepción: Reception Date:		No Lib:
Tipo: Type:		Fecha de Realización: Realization Date:		
Información del CLIENTE: Nombre: Dirección:				
Cantidad: Quantity:	No. Lote: Lot No:	Peso Neto: Net Weight:	Página: 1 de 1 Page: of	

No.	Característica /Characteristic	Método utilizado/ Method	Resultado/ Result	Especificaciones/ Specification NC: 371:2012
1	Azúcares Reductores g/100g	Determinación del contenido aparente de azúcares reductores/ NC 730:2012		No menor de 60g/100g
2	Sacarosa (g/100g) Sucrose	Determinación del contenido aparente de sacarosa/NC 730:2012.		No mayor de 5 g/100g
3	Color (mm de Pfund) Colour	Determinación del color/ NC 730:2012		
4	Conductividad Eléctrica. (mS/cm) Electric Conductivity	Determinación de la conductividad eléctrica/ NC 730:2012		No mayor de 0.8 mS/cm
5	Sólidos Insolubles en agua (g/100g) Non Soluble Solids in water.	Determinación de los sólidos insolubles en agua en la miel de abejas/ NC 730:2012		No mayor 0,1 g/100g
6	Humedad (g/100g) Humidity	Determinación de humedad. Método refractométrico/ NC 730:2012		No mayor de 20 %
7	Actividad Diastásica (U Schade) Diastase Activity	Determinación del índice de diastasa en la miel de abejas. Método de Schade/ NC 730:2012		No menor de 8 U Schade
8	Hidroximetilfurfural (mg/1000g) Hidroximetilfurfural	Determinación del contenido de Hidroximetilfurfural en la miel. Método de White/ NC 730:2012		No mayor de 40 mg/1000g
9	Acidez Libre (meq/1000g) Free Acidity	Determinación de la acidez de tipo libre en la miel de abejas/ NC 730:2012		No mayor de 50 meq/1000g

Los resultados que se presentan en este Informe de Ensayo solo están relacionados con el Número de lote declarado/ The results presented in this Test Report only relate to the said Lot number.

Este INFORME DE ENSAYO NO debe ser reproducido, sin la aprobación escrita de la Dirección de la UCTB de Calidad del Centro de Investigaciones Apícolas/ This Test Report should not be reproduced without the authorization of the Executive of Quality of the Research Centre of Apiculture.

El Lote está CONFORME con los requisitos y/o especificaciones declaradas en este documento/This lot is CONFORM to your request and specific by declared in this document.

Las declaraciones relacionadas no están avaladas por lo establecido en los Criterios de Acreditación que aplica el Órgano Nacional de Acreditación de la República de Cuba (ONARC)/ Statements related not warranted by the provisions of the Accreditation Criteria applied by the National Accreditation Authority of the Republic of Cuba.

Director UCTB de Calidad/ Director Quality

Cuño/Die

Firma/Signature



### Bibliografía

- [1] ALINORM 01/25/2000: Informe de la Séptima reunión del Comité del Codex sobre Azúcares.
- [2] Directiva 2001/110/CE Nueva Legislación de la Miel.
- [3] Official Methods of Analysis AOAC, No. 980.23, edition 15 (1990).
- [4] S. Bogdanov, 2002. *Determination of proline. Harmonized methods of the international honey commission, 2002, p. 58-59.*
- [5] NC 143: 2010 Código de prácticas — Principios generales de higiene de los alimentos.
- [6] NC 556: 2007 Principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos para los alimentos.
- [7] S. Bogdanov, *Determination of Hidroxymethylfurfural after White. Harmonized methods of the international honey commission, 2002, p. 28-30.*
- [8] S. Bogdanov, *Determination of electrical conductivity. Harmonized methods of the international honey commission. 2002, p 15-17.*