

**Best. Nr.** GLY 742  
**Inhalt:** 40 Tests

**Methode**  
Enzymatischer Farbttest, GPO-PAP-Methode

	GK	
Glycerin + ATP	→	Glycerin-3-phosphat + ADP
	GPO	
Glycerin-3-phosphat + O <sub>2</sub>	→	Dihydroxyaceton- Phosphat + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	Peroxidase	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2,4-Dichlorphenol	→	Chinoniminfarbstoff
+ 4-Aminophenazon		

#### Reagenz

Inhalt / Konzentrationen:

- Startreagenz (Kappen in PE-Flasche)  
L-Glycerin-3-phosphat-oxidase (GPO) aus Mikroorganismen > 3,5 kU/L, Glycerokinase (GK) aus *Bacillus stearothermophilus* > 0,9 kU/L, Peroxidase (POD) > 3,5 kU/L, ATP 2,4 mmol/L, 4-Aminophenazon 0,15 mmol/L
- Pufferlösung (vorpportioniert in Rundküvetten)  
2,4-Dichlorphenol 4 mmol/L, Natriumazid < 0,1 %, Triton X-100 < 1%, PIPES-Puffer 50 mmol/L, pH 7,5

#### Sicherheitshinweis

Die Pufferlösung (Rundküvette) enthält Natriumazid (< 0,1 %) und Triton X-100 (< 1%). Verschlucken, Berührung mit der Haut und Schleimhäuten vermeiden. Ein Sicherheitsdatenblatt wird auf Anforderung zur Verfügung gestellt.<sup>1)</sup>

#### Lagerung und Haltbarkeit

Die Testreagenzien sind bei +2°C bis +8°C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfalldatum haltbar. Schraubkappen erst unmittelbar vor der Messung aus dem Behälter entnehmen.

#### Messbedingungen

Messgerät: Biodiesel Photometer Diaglobal

Messwellenlänge: 520nm

Temperatur: Raumtemperatur

Der Algorithmus zur Berechnung des Analyseergebnisses ist in dem genannten Photometer einprogrammiert.

#### Arbeitsanleitung für wässrige Lösungen

##### Probenmaterial

Glycerinphase aus der Biodieselherstellung, glycerinhaltige wässrige Lösungen

##### Arbeitsanleitung

###### A. Glycerinpräparate

Probe 1:1000 wie folgt verdünnen:  
Genau 1,26 g des Glycerinproduktes auf der Analysenwaage abwägen, in VE-Wasser lösen und im Messkolben auf 1L auffüllen.  
Von dieser Lösung 10 µL zur Bestimmung einsetzen.  
Die Bestimmung kann als Einzelmessung oder in Serie (mit Saldierung der E(0)-Werte = Nullpunkte) durchgeführt werden.

In Rundküvette pipettieren:	
	Analyse
Verdünnte Probe	10 µL
Mischen	

- Test <GLY wäss.> anwählen
- Küvette mit Probe in das Photometer einsetzen (Nullpunkteinstellung)
- Kappe aus der PE-Flasche aufschrauben und Startreagenz durch mehrmaliges Kippen aus der Kappe lösen
- Taste [ON/ENTER] drücken
- Küvette sofort wieder in das Photometer einsetzen
- Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Messergebnis der Probe in mg/dL und % angezeigt

##### Berechnung

Angezeigtes Ergebnis = GLY [mg/dL]\*  
= GLY [%]\*\*

\* Glycerin-Konzentration d. wässrigen Lösung

\*\* Glycerin-Gehalt d. unverdünnten Probe in %

##### Messbereich

12,6 - 200 mg/dL bzw. 10 - 110 %

Liegt die Glycerinkonzentration unter 10%, ist das Verdünnungsverhältnis entsprechend zu modifizieren.

Zum Beispiel:

Probe 1: 100 verdünnen (Ergebnis / 10) bzw.

Probe 1: 10 verdünnen (Ergebnis / 100)

##### B. Wässrige Glycerinlösungen

1 mL Lösung auf 1 L (1:1000) mit VE-Wasser verdünnen. 10 µL zur Bestimmung einsetzen.

Testdurchführung wie oben angegeben.

##### Richtigkeitskontrolle

Die Richtigkeit der Messung kann durch Mitführen eines Vergleichspräparates (z.B. Glycerin p.a., Merck) überprüft werden.

#### Arbeitsanleitung für organische Proben

##### Probenmaterial

Biodiesel (Endprodukt)  
Biodiesel-Phase während des Herstellprozesses

Zusätzlich erforderlich:  
**LH 051** Reaktionsgefäße mit Styroporperlen

##### Arbeitsanleitung

Die Bestimmung wird als Einzelmessung durchgeführt. Die wasserunlöslichen Fettsäuremethylester, die eine starke Trübung der Pufferlösung verursachen würden, werden durch Adsorption an Styroporperlen aus dem Bestimmungsansatz entfernt.

- **1000 µL** VE-Wasser in das Reaktionsgefäß mit Styroporperlen geben
- **20 µL** Biodiesel auf die Styroporperlenschicht auftragen und Kapillarpipette mit der wässrigen Lösung spülen
- Inhalt des Reaktionsgefäßes durch mehrfaches kräftiges Schütteln vermischen
- 1 Minute stehen lassen
- **500 µL** der wässrigen Lösung in die Pufferlösung GLY 742 pipettieren
- Test <GLY org.> anwählen
- Küvette mit Probe in das Photometer einsetzen (Nullpunkteinstellung)
- Kappe aus der PE-Flasche aufschrauben und Startreagenz durch mehrmaliges Kippen aus der Kappe lösen
- Taste [ON/ENTER] drücken
- Küvette sofort wieder in das Photometer einsetzen
- Nach Ablauf der Reaktionszeit (2 - 3 Min.) wird das Messergebnis in Ma% im Display angezeigt

##### Berechnung

Konzentration des Glycerins:

c (mg/dL) = Ext x Faktor

Umrechnung in Massenprozent :

c (Ma%) = c (mg/dL) / Dichte (Biodiesel) / 1000

Dieser Wert wird vom Gerät ausgegeben.

Die Dichte des Biodiesels ist mit 0,8776 g/cm<sup>3</sup> angesetzt.

##### Messbereich

0,001 - 0,250 Ma%

##### Verdünnen bei Überschreitung des Messbereiches

Erscheint im Display die Anzeige GLY > 0,25 Ma%, liegt der Glyceringehalt oberhalb des Messbereiches.

In diesem Falle empfiehlt es sich, die im Reaktionsgefäß enthaltene wässrige Restlösung mit VE-Wasser 1:20 zu verdünnen und die Bestimmung mit 500 µL dieser Verdünnung zu wiederholen. Ergebnis x 20

#### Hinweise

- Soll die Glycerinkonzentration lediglich zur Korrektur des Triglyceridwertes ermittelt werden, empfiehlt es sich, die Bestimmung nach dem Arbeitsgang TRI 742 durchzuführen (Reagenz: GLY 742, Mode <TRI>, Ergebnis in g/dL TRI).
- Das Gesamt-Glycerin - also die Summe aus freiem und in den Mono-, Di-, und Triglyceriden gebundenem Glycerin nach EN 14105 kann ebenfalls mit dem Triglyceridtest TRI 742 bestimmt werden.

#### Hinweise zur Entsorgung

Abfallschlüsselnummer 180106:

Küvetten mit Reagenz gelten als Sonderabfall. Reagenz nicht in Oberflächenwasser oder die Kanalisation gelangen lassen.

Entsorgung gemäß den behördlichen Vorschriften.

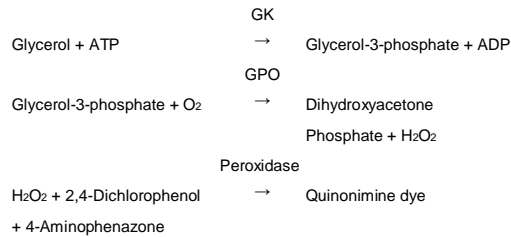
Nichtkontaminierte und restentleerte Verpackungen können einer Wiederverwertung zugeführt werden.

#### Literatur

- <http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html>

**Order No.** GLY 742  
**Contents:** 40 tests

**Method**  
Enzymatic colorimetric test, GPO-PAP method



**Reagents**  
Contents / concentrations of the ready-to-use solution:

1. Starter reagent (screw caps)
  - L-glycerol-3-phosphate-oxidase (GPO) from microorganisms > 3.5 kU/L, Glycerokinase (GK) from bacillus stearothermophilus > 0.9 kU/L, Peroxidase (POD) >3.5 kU/L, ATP 2.4 mmol/L, 4-Aminophenazone 0.15 mmol/L
2. Buffer solution (pre-portioned in round cuvettes)
  - 2,4-Dichlorophenol 4 mmol/L, Sodium azide < 0.1 %, Triton X-100 < 1%, PIPES-buffer 50 mmol/L, pH 7.5

**Safety information**  
The buffer solution (round cuvette) contains sodium azide (< 0.1 %) and Triton X-100. Do not swallow and avoid contact with skin and mucous membranes. If desired a safety data sheet will be provided.<sup>1)</sup>

**Storage and shelf life**  
The test reagents can be kept at a temperature between +2°C and +8°C until the expiry date indicated on the packaging. Please take the screw caps out of the container just before the analysis.

**Measurement conditions**  
Measurement device: Biodiesel Photometer Diaglobal

Meas. wavelength: 520nm

Temperature: Room temperature

The algorithm to compute the analysis result is coded in the above-named photometer.

### Working instructions for aqueous solutions

**Sample material**  
Aqueous glycerol solutions

**A. Compounds of glycerol**  
Dilute sample 1 : 1000 in this way: Weigh exactly 1.26 g from the glycerol compound, dilute with dest. water and fill up to 1 L in volumetric flask. Take 10 µL from this solution for measurement.  
The measurement can be performed as a single as well as a serial measurement (with a balancing of the A (0) values = blank values).

Pipette into round cuvette:	
	Analysis
Sample	10 µL
Mix thoroughly	

- Select <GLY aqu.>
- Insert analysis cuvette (blank value)
- Screw the cap from PE-bottle onto the cuvette, dissolve the starter reagent by inverting several times
- Press [ON/ENTER]
- Insert cuvette into the photometer immediately
- After the end of the reaction the measurement result of the sample is shown in mg/dL and in % resp.

**Calculation**  
Result on display = GLY [mg/dL]  
= GLY [%]

**Measurement range**  
12.6 - 200 mg/dL resp. 10 - 110 %

**B. Aqueous glycerol solutions**  
Fill up 1 mL solution to 1 L (1:1000) with dest. water. Take 10 µL from this solution for measurement. Procedure of measurement like stated above.  
If the glycerol concentration is expected to be less than 10%, please dilute as follows:  
Dilute sample 1: 100, result / 10  
Dilute sample 1: 10, result / 100

**Note**  
For the calculation of the glycerol concentration in percent v/v, the density of glycerol 1.26 g/cm<sup>3</sup> has been used.

### Working instructions for biodiesel

**Sample material**  
Biodiesel

Additionally required:  
**LH 051** Reaction tubes with polystyrene pearls

**Working instructions**  
Indissoluble fatty acid methyl ester which may create a turbidity in buffer solution will be eliminated through the adsorption on polystyrene pearls.

- Pipette **1000 µL** dest. water in reaction tube with polystyrene pearls
- Pipette **20 µL** biodiesel with micropipettor on polystyrene pearls and wash out well
- Mix thoroughly by shaking it well
- Wait 1 minute
- Pipette **500 µL** aqueous solution into cuvette GLY 742 with buffer solution
- Select <GLY org.>
- Insert analysis cuvette (blank value)
- Screw the screw cap from PE-bottle onto the cuvette, dissolve the starter reagent by inverting several times
- Press [ON/ENTER]
- Insert cuvette into the photometer immediately
- At the end of the reaction time (2 - 3 min) the measurement result will be displayed in Ma%

**Calculation:**  
Concentration of glycerol:  
c (mg/dL) = absorbance x factor  
c (Ma %) = c (mg/dL) / density (biodiesel) / 1000  
This value is shown on the display.  
Density of biodiesel: 0,8776 g/cm<sup>3</sup> has been used

**Measurement range**  
0.001 - 0.250 Ma%

**Dilute when exceeding the measurement range**  
In case of exceeding measurement range, on display will shown > 0.25 Ma%. In that case dilute the rest aqueous solution of reaction tube with dest. water (1:20) and repeat the measurement with 500 µL of this dilution.  
Result x 20

**Note**  
If the glycerol concentration required only for correction of triglycerid value please perform the measurement with reagent GLY 742 in mode <TRI>. Result in g/dL TRI

**Information on disposal**  
Waste code number 180106:  
Vials with reagent are considered hazardous waste. Do not allow reagent to reach surface water or sewage system. Dispose of in accordance with official regulations. Non-contaminated and completely empty packaging can be recycled. Non-contaminated and completely empty packaging can be recycled.

**Bibliography**  
1. <http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html>