

Best. Nr. TRI 742
Inhalt: 40 Tests

Methode
 Enzymatischer Farbstest, GPO-PAP-Methode

Probenmaterial
 Biodiesel

Reagenz
 Inhalt / Konzentrationen:
 1. 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
 2. Pufferlösung (vorportioniert in Rundküvetten)
 Lipoproteinlipase aus Mikroorg. > 7,5 kU/L, 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.¹⁾

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 Analysenergebnisses ist in dem genannten Photometer einprogrammiert.

Messbereich
 Mode <TRI> 0,1 - 23,0 g/dL
 Mode <TRI konz> 1,1 - 165 g/dL

Arbeitsanleitung
 Die Bestimmung kann als Einzelmessung oder in Serie (mit Saldierung der E(0)-Werte = Nullpunkte) durchgeführt werden.

In Rundküvette pipettieren:	
	Analyse
Biodiesel-Probe	1 µL
1 µL Probe mit Kapillarpipette zugeben, dabei Ringmarkeneinteilung beachten: 1-2-3-4-5 µL 30 Sekunden intensiv vertikal schütteln oder mit Vibrationsmischer mischen. 1 Minute stehen lassen. Lösung muss klar sein.	

- Test <TRI> 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 Ergebnis ablesen

Berechnung
 Extinktion x Faktor = TRI [g/dL]

Verdünnen bei Überschreitung des Messbereiches
 Wird der Messbereich überschritten (Anzeige: > 15 g/dL), muß die Probe mit freigegebenem Biodiesel 1+10 verdünnt und die Messung im Mode <TRI konz.> mit 1 µL der verdünnten Probe wiederholt werden. Siehe: **Vorgehensweise beim Verdünnen von Biodiesel**
 Der angezeigte Messwert ist bereits mit dem Faktor 11 multipliziert und kann direkt abgelesen werden.

Tipp
 Zur Pipettierung von 1µL Probe empfehlen wir unsere Kapillaren 1 - 5 µL Bestell.-Nr. LH 021 und den Mikropipetter (Pipettierhilfe) Bestell.-Nr. LH 007

Messprinzip

Triglyceride + H ₂ O	Lipase =>	Glycerin + freie Fettsäuren
Glycerin + ATP	GK →	Glycerin-3-phosphat + ADP
Glycerin-3-phosphat + O ₂	GPO →	Dihydroxyaceton- Phosphat + H ₂ O ₂
H ₂ O ₂ + 2,4-Dichlorphenol + 4-Aminophenazon	Peroxidase →	Chinoniminfarbstoff

GK = Glycerokinase, GPO = Glycerin-3-phosphat-oxidase

Die Konzentration des Chinoniminfarbstoffes ist ein Maß für die Triglyceridkonzentration im Biodiesel und wird photometrisch bei 520 nm gemessen. Das Erreichen des Endpunktes der Reaktion wird vom Meßgerät selbsttätig erkannt.

Kalibrierfunktion
 Neben den Triglyceriden werden die Mono- und Diglyceride sowie das freie Glycerin mit erfasst. Diese Störung, die insbesondere bei niedrigen Triglyceridkonzentrationen ins Gewicht fällt, kann ggf. über eine Kalibrierfunktion, die man durch Auftragung der gemessenen gegen die gaschromatografisch ermittelten Werte erhält, eliminiert werden.

Berechnung des Gesamt-Glycerins
 Aus dem unkorrigierten Triglyceridwert kann auch das Gesamt-Glycerin (also die Summe aus freiem und gebundenem Glycerin nach DIN EN 14214) berechnet werden:

$$\begin{aligned} \text{TRI (g/dL)} / 877 \times 92 &= \text{GesGly (g/dL)} \\ \text{GesGly (g/dL)} / 0,8776 &= \text{GesGly (Ma\%)} \\ 877 &= \text{Molekulargewicht Triglyceride [g/mol]} \\ 92 &= \text{Molekulargewicht Glycerin [g/mol]} \\ 0,8776 &= \text{Dichte Biodiesel [g/cm}^3\text{]} \end{aligned}$$

Vorgehensweise beim Verdünnen von Biodiesel

- 500µL Biodiesel mit der Pipette in eines der Mischgefäße pipettieren
- 50µL Biodieselprobe mit der Kapillare entnehmen und in das Mischgefäß geben
- Mischgefäß verschließen und sorgfältig mischen
- Am Gerät den Mode <TRI konz> anwählen und die Messung wie gewohnt mit 1 µL der verdünnten Probe aus dem Mischgefäß durchführen (siehe Anleitung „Schritt für Schritt“)
- Der angezeigte Messwert ist bereits mit dem Faktor 11 multipliziert.

Zubehör zum Verdünnen von Biodiesel
 500µL Pipette mit 50 Spitzen, *Best.-Nr. LH 500*
 Mischgefäße, 500 Stück, *Best.-Nr. LH 050*
 50µL Kapillaren, 100 Stück, *Best.-Nr. LH 056*

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

Order No. TRI 742
Contents: 40 tests

Method
 Enzymatic colorimetric test, GPO-PAP method

Sample material
 Biodiesel

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-Aminophenazon 0.15 mmol/L
 2. Buffer solution (pre-portioned in round cuvettes)
 Lipoprotein lipase from microorg. > 7.5 kU/L, 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.¹⁾

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 photometers.

Measurement range
 Mode <TRI> 0.1 - 23.0 g/dL
 Mode <TRI conc> 1.1 - 165 g/dL

Working instructions
 The measurement can be performed as a single or serial measurement (with a balancing of the A(0) counts = blank values).

Single measurement

Pipette into round cuvette:	
	Analysis
Sample	1 µL
Add 1 µL sample with capillary pipette, consider ring mark: 1-2-3-4-5 µL Mix vertical and intensive for 30 seconds or mix with vibration mixer. Wait for 1 minute before use. Solution needs to be clear.	

- Select the <TRI> test
- 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
- Wait for result

Calculation
 Absorbance x factor = TRI [g/dL]

Dilute when exceeding the measurement range
 If the measurement range is exceeded (display: > 15 g/dL) dilute the sample with freed biodiesel 1+10 and repeat the measurement in mode <TRI conc> with 1 µL diluted sample. See **Biodiesel dilution procedure**
 The displayed measurement value has already been multiplied by the factor 11 and may be read directly.

Tip
 We recommend our capillaries 1 - 5 µL for pipetting 1µL sample order no. LH 021 and the micropipettor (pipettor help) order no. LH 007

Measurement principle

Triglycerides + H ₂ O	Lipase ⇌	Glycerol + Free fatty acids
Glycerol + ATP	GK →	Glycerol-3-phosphate + ADP
Glycerol-3-phosphate + O ₂	GPO →	Dihydroxyacetone Phosphate + H ₂ O ₂
H ₂ O ₂ + 2,4-Dichlorophenol + 4-Aminophenazon	Peroxidase →	Quinonimine dye

GK = Glycerokinase, GPO = Glycerol-3-phosphate-oxidase

The concentration of the quinonimine dye is a measure for the triglyceride concentration in blood and serum/ plasma respectively and is measured photometrically at 520 nm. Reaching the end point of the reaction is identified automatically by the device itself. Free glycerol in serum, whose concentration corresponds to a triglyceride value of 10 mg/dl if the person is healthy, is measured, too.

Calibration function
 Besides triglycerides also monoglycerides and diglycerides as well as free glycerine become measured.

In case of lower triglyceride concentration we recommend to adjust the result through a calibration function that has to be determined empirically. For this the unadjusted values, measured in g/dL, are plotted against values that have been measured parallel with the reference method (gas chromatography).

Calculation of total glycerine
 The unadjusted triglyceride value allows to calculate total glycerine (the sum of free and bound glycerine n. DIN EN 14214) as well:

$$\begin{aligned} \text{TRI (g/dL)} / 877 \times 92 &= \text{TotGly (g/dL)} \\ \text{TotGly (g/dL)} / 0.8776 &= \text{TotGly (Ma\%)} \\ 877 &= \text{Molecular weight triglycerides [g/mol]} \\ 92 &= \text{Molecular weight glycerine [g/mol]} \\ 0.8776 &= \text{Density biodiesel [g/cm}^3\text{]} \end{aligned}$$

Biodiesel dilution procedure

- Pipette 500µL biodiesel into a mixing vessel
- Withdraw 50µL biodiesel sample with the capillary and insert into the mixing vessel
- Close mixing vessel and mix thoroughly
- Select mode <TRI conc> and realise the measurement as usual with 1 µL of the diluted sample from the mixing vessel (see instruction „Step by Step“)
- The displayed measurement value has already been multiplied by the factor 11.

Accessories for dilution of biodiesel
 500µL pipette with 50 tips, order no. LH 500
 Mixing vessels, 500 pcs., order no. LH 050
 50µL capillaries, 100 pcs., order no. LH 056

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>