



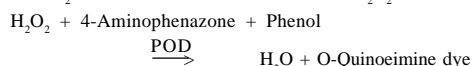
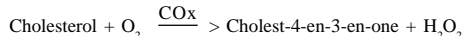
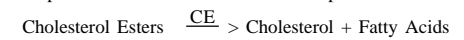
## Stanbio Cholesterol LiquiColor® Procedure No. 1010

Quantitative-Enzymatic-Colorimetric Determination  
of Total and HDL Cholesterol in Serum or Plasma

### Summary and Principle

The enzymatic approach to cholesterol methodology was introduced in 1973 by Flegg<sup>1</sup> and Richmond<sup>2</sup>, using cholesterol oxidase of bacterial origin following chemical saponification of the cholesterol esters. Roeschlau<sup>3</sup> modified this technique and Allain et al.<sup>4</sup> published the first fully enzymatic assay, combining cholesterol oxidase and cholesterol esterase. The method presented is based on the Allain procedure and utilizes these enzymes in combination with the peroxidase/phenol-4-antipyrine reagent of Trinder.<sup>5</sup>

Cholesterol esterase (CE) hydrolyzes esters to free cholesterol and fatty acids. The free cholesterol so produced plus the preformed cholesterol are then oxidized in the presence of cholesterol oxidase (CO<sub>x</sub>) to cholest-4-en-3-one and hydrogen peroxide. A quinoneimine chromogen, with absorption maxima at 500 nm, is produced when phenol is oxidatively coupled with 4-aminophenazone in the presence of peroxidase (POD) with hydrogen peroxide. The intensity of the final red color is proportional to total cholesterol concentration. Lipid Clearing Factor (LCF): a mixture of special additives developed by Stanbio is integrated into the cholesterol reagent to help minimize interference due to lipemia.



**A technique for high density lipoprotein (HDL) cholesterol utilizing Stanbio HDL Precipitating Reagent, Cat. No. 0599, must be procured separately.**

### Reagents

#### Enzymatic Cholesterol Reagent, Ref. No. 1011

Reagent contains the following active ingredients at stated concentrations

4-Aminophenazone	0.25	mmol/L
Phenol	25.0	mmol/L
Peroxidase	> 5.0	U/mL
Cholesterol Esterase	> 0.15	U/mL
Cholesterol Oxidase	> 0.1	U/mL

Buffers and Stabilizers

#### Cholesterol Standard, Ref. No. 1012 (200 mg/dL)

Buffered aqueous solution of cholesterol with stabilizers, surfactants and preservative.

**Precautions:** *For In Vitro Diagnostic Use Only.* Dispose of reagents in accordance with local requirements.

**Reagent Preparation:** Reagent and Standard are ready to use.

**Reagent Storage and Stability:** Reagent and Standard are stable stored at 2-8°C until expiration date on label. Once Reagent is opened, contamination must be avoided. Bring Reagent and Standard to room temperature before use.

### Materials Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance readings at 500 nm.

Accurate pipetting devices

Cuvets, Test Tubes, Centrifuge, Interval Timer, Mixer (Vortex type)

Constant temperature bath, or block, 37° (Optimal)

### Specimen Collection and Preparation<sup>6</sup>

Blood should be collected following a 12-hour fast. Specimen may be serum, or plasma collected with EDTA as anticoagulant. Avoid hemolysis.

**Sample Stability:** Both total cholesterol and HDL cholesterol are reportedly stable 4 days at 2-8°C. Extended stabilities at -20°C are 3 months for "Total" and 7-14 days for "HDL". Whenever possible, specimens should be separated and analyzed on the day of collection.

**Interfering Substances:** Anticoagulants such as fluoride and oxalate will result in false low values. The test is not influenced by hemoglobin values up to 200 mg/dL or by bilirubin levels up to 10 mg/dL. However, interference from grossly icteric and heavily hemolyzed specimens is correctable by use of a serum/plasma blank (refer to "Results" section).

### Automated Analyzers

#### Parameters:

Wavelength	500 nm
Reaction Type	Endpoint
Reaction Direction	Increasing
Reaction Temperature	37°C
Sample/Reagent Ratio	1:100
Equilibration Time	3 Seconds
Read Time	4 Seconds
Lag Time	300 Seconds
Blank Absorbance Limit	0.30A
High Absorbance	2.000A
Standard	200 mg/dL
Low Normal	120 mg/dL
High Normal	310 mg/dL
Linearity	750mg/dL

Above parameters should be employed in programming automated analyzers for Cholesterol. Consult your instrument manual for programming instructions. Specific programming applications for most automated analyzers are available from Stanbio Customer Service Department

### Test Performance

1. Pipet into cuvetts the following volumes (mL) and mix well:

	Reagent Blank (RB)	Standard (S)	Sample (U)
Reagent	1.0	1.0	1.0
Standard	—	0.01	—
Sample	—	—	0.01

2. Incubate all cuvetts at 37°C for 5 minutes or at room temperature for 10 minutes.

3. Read S and U vs. RB at 500 nm within 60 minutes.

**Quality Control:** Use of commercial control serum, or pooled serum previously assayed and divided into frozen aliquots, is recommended for use with each series of assays.

### Results

Values are derived by the following equations:

$$\text{Serum Total Cholesterol (mg/dL)} = \frac{A_u}{A_s} \times 200$$

Where Au and As are the absorbance values of unknown and standard, respectively, and 200 the concentration of the standard (mg/dL).

When a serum blank is required (icteric or hemolyzed specimen), label another tube SB (Step 1, "Procedure" section). Add 1.0 mL "normal" saline 0.01 mL serum, mix by inversion, transfer to cuvet and read absorbance (Asb) vs. distilled water at 500 nm. Use this value to correct that of the unknown as follows:

$$\text{Serum Total Cholesterol (mg/dL)} = \frac{A_u - A_{sb}}{A_s} \times 200$$

NOTE: Samples having cholesterol values greater than 750 mg/dL are diluted 3-fold (1+2) with normal saline (sodium chloride, 8.5 g/L), the assay repeated and results multiplied by the dilution factor of 3.

### Expected Values<sup>7</sup>

Recent data are presented showing "normal ranges" according to age for total and HDL Cholesterol, and as to the risk of coronary heart disease (CHD) for HDL. Cholesterol expressed as percent of total cholesterol. It is recommended that each laboratory establish its own range of expected values, since differences exist between instruments, laboratories, and local populations.

Total Cholesterol	(mg/dL)
Cord	45-100
Newborn	53-135
Infant	70-175
Child	120-200
Adolescent	120-210
Adult	140-310
Desirable for Adults	140-200

Risk of CHD (HDL as % of total)		
Risk	Male	Female
Dangerous	< 7	< 12
High	7-15	12-18
Average	15-25	18-27
Below Average	25-37	
Probable Protection	> 37	> 40

HDL Cholesterol		
Age	Male	Female
0-14	30-65	30-65
15-19	30-65	30-70
20-29	30-70	30-75
30-39	30-70	30-80
> 40	30-70	30-85
Mean	45	55
Blacks: Approx. 10 mg/dL higher		

### Performance Characteristics

**Reproducibility:** A study was performed on a control serum (mean = 128 mg/dL) and on a patient's serum (mean = 367mg/dL), which consisted of a series of 5 assays on each of 5 days. Coefficients of variation (CV) were within run 2.5% and 1.0% and between-run (day-to-day) 3.5% and 2.9%, respectively.

**Correlation:** Determination of cholesterol by the procedure described (y) and by the Boehringer-Manheim "BMC Cholesterol Monotest" (x) on 66 sera (range 125-550 mg/dL) showed a correlation coefficient (r) of .991 and a regression equation of y = 1.04x-9.3.

**Linearity:** Linear from 0 to 750 mg/dL.

### References

- Flegg HM. Ann Clin Biochem 10:79, 1973
- Richmond W. Clin Chem 19:1350, 1973
- Roeschlau P et al. Z Klin Chem Klin Biochem 12:226, 1974.
- Allain CC et al. Clin Chem 20:470, 1974.
- Trinder P. Ann Clin Biochem 6:24, 1969.
- Finley PR et al. Clin Chem 24:391, 1978
- Stein EA. in Textbook of Clinical Chemistry, NW Tietz, ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1986, pp. 879-886, 1818, 1829.

Manufactured By:

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006 USA  
Ph: (830) 249-0772 • Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com  
http://www.stanbio.com

DN: RBR.1010CE.01 • Last Revision: 01/04 • Procedure No. 1010



## Stanbio LiquiColor® Colesterol (Trinder), Proced. No. 1010

Para la determinación de Colesterol Total y HDL en suero ó plasma

### Resúmen y Principio

El método enzimático para colesterol fue introducido en 1973 por Flegg<sup>1</sup> y Richmond<sup>2</sup>, utilizando colesterol oxidasa de origen bacteriano seguida de saponificación química de los ésteres del colesterol. Roeschlau<sup>3</sup> modificó ésta técnica y Allain y Col<sup>4</sup> publicó los primeros ensayos enzimáticos completos combinando el colesterol oxidasa y el colesterol estearasa. Este método se basa en el de Allain y utiliza estas enzimas en combinación con el reactivo peroxidasa/fenol-4-antipirina, de Trinder<sup>5</sup>.

La colesterol estearasa (CE) hidroliza a los ésteres del colesterol para dar colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre así producido más el colesterol preformado se oxidan en presencia de la colesterol oxidasa (COx) para dar colestén-4-3-cetona y peróxido de hidrógeno. Un cromógeno quinonaimina, con absorción máxima a 500 nm, se produce cuando el fenol se acopla oxidativamente con 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa (POD) con peróxido de hidrógeno. La intensidad final del color rojo es proporcional a la concentración total del colesterol. El Factor Aclarador Lipemico (LCF) es una mezcla de aditivos especialmente diseñados por Stanbio integrados dentro del reactivo de colesterol para ayudar a minimizar las interferencias debidas a la Lipemia.

Esteres del colesterol  $\xrightarrow{CE}$  Colesterol + Ácidos Grasos

Colesterol + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{COx}$  Colestén-4-3-cetona + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-Aminofenazona + fenol  $\xrightarrow{POD}$  H<sub>2</sub>O + O-Quinonaimina colorante

Una técnica para lipoproteínas de alta densidad HDL como el colesterol que utiliza el reactivo de precipitación HDL Stanbio, se adquiere por separado.

### Reactivos

#### Colesterol Enzimático (líquido), Ref. No. 1011

El reactivo contiene los siguientes ingredientes activos a esta concentración.  
4-aminofenazona ..... 0.25 mmol/L  
Fenol ..... 25.0 mmol/L  
Peroxidasa ..... > 5.0 U/mL  
Colesterol Estearasa ..... > 0.15 U/mL  
Colesterol Oxidasa ..... > 0.1 U/mL

#### Estandar de Colesterol (200 mg/dL), Ref. No. 1012

Solución acuosa de colesterol en buffer, con estabilizadores, surfactantes y preservativos.

**Precauciones:** Para uso de diagnóstico in vitro.

**Preparación del Reactivos:** El reactivo y el estandar estan listos para usarse.

**Estabilidad y almacenamiento del Reactivo:** El reactivo y el estandar conservados a 2-8°C, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez abierto, evite su contaminación. Con el tiempo el reactivo puede tomar un leve color rosado que no afecta los resultados. Descartar el reactivo se la absorbancia contra blanco de agua es superior a 0.3 D.O. a 500 nm. Lleve el reactivo y el estándar a temperatura ambiente antes de usarlos.

### Materiales Requeridos Pero No Incluidos

Espectrofotómetro para absorbancias a 500 nm  
Pipetas para medir 0.01 y 1.0 mL (Ensayo de colesterol total)  
Celdillas Tubos de Ensayo Centrifuga  
Cronómetro Agitador (tipo Vortex)  
Baño a temperatura constante o parrilla, 37°C (opcional)

### Recolección y Preparación de la Muestra<sup>6</sup>

La muestra de sangre debe extraerse con ayuno de 12 hrs. Puede ser suero o plasma colectado con EDTA como anticoagulante, evite la hemólisis.

**Estabilidad de la Muestra:** El colesterol total y el colesterol HDL se reportan estables cuatro días a 2-8°C. Mayor estabilidad alcanzan a -20°C por tres meses para el "total" y 7-14 días para el HDL. De ser posible la muestra debe separarse y analizarse el mismo día de su extracción.

**Substancias Interferentes:** Los anticoagulantes como fluoruros y oxalatos dan valores bajos falsos. La prueba no se interfiere con valores de hemoglobina hasta de 200 mg/dL o por bilirrubina hasta de 10 mg/dL. Sin embargo muestras muy ictericas y hemolizadas se pueden corregir usando un blanco de suero o plasma (consulte la sección de "resultados").

### Analizador Automatizado

#### Parámetros:

Longitud de onda ..... 500 nm  
Tipo de reacción ..... Punto final  
Dirección de la reacción ..... Incremento  
Temperatura de la reacción ..... 37°C  
Relación muestra/reactivo ..... 1:100  
Tiempo de equilibrio ..... 3 segundos  
Tiempo de lectura ..... 4 segundos  
Tiempo lag ..... 300 segundos  
Absorbancia límite del blanco ..... 0.300  
Máxima absorbancia ..... 2.000 A  
Estandar ..... 200 mg/dL  
Valor normal bajo ..... 120 mg/dL  
Valor normal alto ..... 310 mg/dL  
Linealidad ..... 750 mg/dL

Estos parámetros son para usarse en el programador del analizador automático para Colesterol. Consulte el manual del instrumento para instrucciones.

### Procedimiento Manual

1. Pipetee en las celdillas los siguientes volúmenes (mL) y mezcle bien.

	Reactivo Blanco (RB)	Estandar (S)	Muestra (U)
Reactivo	1.0	1.0	1.0
Estandar	—	0.01	—
Muestra	—	—	0.01

**NOTA:** Los volúmenes pueden incrementarse proporcionalmente si el espectrofotómetro requiere de mas de 1.0 mL.

2. Incube todas las celdillas a 37°C por 5 minutos o por 10 minutos a temperatura ambiente.

3. Lea S y U contra RB a 500 nm antes de 60 minutos.

**Control de Calidad:** Se recomienda en cada ensayo incluir sueros control comerciales o un pool de sueros previamente analizado y dividido en alícuotas congeladas.

### Resultado

Los valores se derivan de la siguiente ecuación:

$$\text{Colesterol total sérico (mg/dL)} = \frac{A_u}{A_s} \times 200$$

Donde Au y As son las absorbancias de la muestra y del estandar respectivamente y 200 es la concentración del estandar (mg/dL).

Cuando se requiera de un blanco de suero (muestra icterica o hemolizada) incluya otro tubo como SB (punto 1, sección "procedimiento"). Añada 1.0 mL de solución salina, 0.01 mL de suero, mezcle por inversión, transfiera a celdillas y lea la absorbancia (Abs) contra agua destilada a 500 nm. Use estos valores para corregir los de la muestra como sigue:

$$\text{Colesterol total sérico (mg/dL)} = \frac{A_u - A_{sb}}{A_s} \times 200$$

**NOTA:** Las muestras con valores de colesterol mayores de 750 mg/dL se diluyen tres veces (1+2) con solución salina normal (cloruro de sodio, 8.5 g/L), se repite el ensayo y el resultado se multiplica por 3.

### Valores Esperados<sup>7</sup>

Los datos recientemente presentados muestran "rangos normales" de acuerdo a la edad para colesterol total. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios rangos de valores esperados en vista de que existen diferencias entre instrumentos, laboratorios y población local.

COLESTEROL TOTAL	mg/dL		
Cordón	45-100		
Recien Nacido	53-135		
Infante	70-175		
Niños	120-210		
Adultos	140-310		
Ideal para Adultos	140-200		
RIESGO DEL CHD (HDL COMO % DEL TOTAL)			
Riesgo	Hombre	Mujer	
Peligroso	< 7	< 12	
Alto	7-15	12-18	
Promedio	15-25	18-27	
Abajo del Promedio	25-37		
Proteccion Probable	> 37	> 40	
HDL CHOLESTEROL			
Edad	Hombre	Mujer	
0-14	30-65	30-65	
15-19	30-65	30-70	
20-29	30-70	30-75	
30-39	30-70	30-80	
> 40	30-70	30-85	
Media	45	55	

Negros: Approx. 10 mg/dL mas alto

### Características

**Reproducibilidad:** Se realizó un estudio sobre un suero control (media = 128 mg/dL) y un suero de pacientes (media = 367 mg/dL) el cual consistió en una serie de 5 ensayos durante 5 días consecutivos. El coeficiente de variación (CV) del interensayo fué de 2.5% y 1.0% y el intraensayo (de día a día) 3.5% y 2.9% respectivamente.

**Correlación:** La determinación del colesterol por el procedimiento aquí descrito (y) y por el método de Boehringer-Mannheim "Monotest Colesterol BMC" (x) en 66 sueros (variación = 125-550 mg/dL) dio un coeficiente de correlación de 0.991 y una pendiente y = 1.04 x - 9.3.

**Linealidad:** Cuando se realiza como dice el método es lineal de 0 a 750 mg/dL.

### Referencias

1. Flegg HM, Ann Clin Biochem 10:79, 1973.
2. Richmond W. Clin Chem 19:1350, 1973.
3. Roeschlau P et al., Z Klin Chem. Klin Biochem 12:226., 1974.
4. Allain CC et al. lin Chem 20:470, 1974.
5. Trinder P. Ann Clin Biochem 6:24, 1969.
6. Finley PR et al. Clin. Chem 24:931, 1978.
7. Stein EA, in Textbook of Clinical Chemistry, NW Tiez, Ed. W.B. Saunder, Philadelphia, 1986, p.p. 879-886, 1818, 1829.

Manufactured By:

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006 USA

Ph: (830) 249-0772 • Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com

http://www.stanbio.com

DN: RBR.1010CE.01 • Last Revision: 01/04 • Procedure No. 1010