



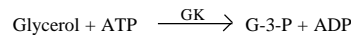
## Stanbio Triglyceride LiquiColor® Procedure No. 2200

For the Quantitative Enzymatic-Colorimetric  
Determination of Triglycerides in Serum or Plasma

### Summary and Principle

Measurement of triglyceride levels, when performed in conjunction with other lipid assays, proves useful in the diagnosis of primary and secondary hyperlipoproteinemia. Triglyceride concentrations are also of interest in following the course of diabetes mellitus, nephrosis, biliary obstruction and various metabolic abnormalities resulting from endocrine disturbances.<sup>1, 2, 3</sup>

- Glycerol and fatty acids are first formed by lipase action on the triglycerides
- Glycerol is then phosphorylated by adenosine-5'-triphosphate (ATP) to produce glycerol-3-phosphate (G-3-P) and adenosine-5' -diphosphate (ADP) in a reaction catalyzed by glycerol kinase (GK):



- The G-3-P is oxidized by glycerylphosphate oxidase (GPO) producing dihydroxyacetone phosphate (DAP) and hydrogen peroxide:



- Peroxide reacts with a 4-aminoantipyrine and 4-chlorophenol under the catalytic influence of peroxidase (POD) to form quinoneimine:



Lipid Clearing Factor (**LCF**): a mixture of special additives developed by Stanbio is integrated into the triglyceride reagent to help minimize interference due to lipemia.

### Reagents

#### Triglyceride LiquiColor® Reagent, Cat. No. 2201

ATP 2.0 mM, Magnesium Salt 15.0 mM, 4-Aminoantipyrine 0.5 mM, 4-Chlorophenol 4mM, Glycerylphosphate Oxidase 1500 U/L, Sodium Azide 0.01% Lipase 4000 U/L, Glycerol Kinase 400 U/L, Peroxidase 2000 U/L, Good's Buffer 50 mM, pH 6.7 ± 0.1.

#### Triglyceride Standard, 200 mg/dL, Cat. No. 2103

Contains glycerol with surfactant to yield 200 mg/dL triglycerides as triolein. Sodium azide 0.01% added as a preservative.

#### Precautions: For In Vitro Diagnostic Use.

Reagent and standard contain sodium azide as a preservative. May react with copper or lead plumbing to form explosive metal azides. Upon disposal, flush with large amounts of water to prevent azide build up.

**Reagent Preparation:** Reagent and standard are supplied ready to use.

**Reagent Storage and Stability:** Triglycerides reagent is stable until expiration date on label when stored at 2-8°C and protected from light. 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 (492-530 nm)  
Accurate pipetting devices • Heat block or water bath, 37°C  
Interval timer • Cuvets

### Specimen Collection and Preparation<sup>2</sup>

**Sample Stability:** Triglycerides are reportedly stable for at least 10 days at 2-8°C. Do not store samples at 15-30°C as phospholipids may hydrolyze, releasing free glycerol and falsely elevating triglyceride values.

**Interfering Substances:** Blood collecting devices containing glycerol (glycerin) cannot be used, such as those having stoppers so lubricated. Gross hemolysis or high bilirubin values, will produce falsely elevated values. A number of drugs and substances affect the determination of triglycerides.

Interference from gross icteric and heavily hemolyzed specimens is correctible by use of serum/plasma blank (refer to "Results" section)

### Automated Analyzer

#### 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 .....	0.500
High Absorbance .....	2.000A
Standard .....	200 mg/dL
Low Normal .....	30 mg/dL
High Normal .....	150 mg/dL
Linearity .....	1000 mg/dL

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

### Manual Procedure

- 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

**NOTE:** Volumes may be increased 2-fold if the instrument requires volumes greater than 1.0mL.

- Incubate all cuvetts at 37°C for 5 minutes, or incubate at room temperature for 10 minutes.
- Read S and U vs RB at 500 nm within 60 minutes.

**Quality Control:** Commercial control sera of known triglyceride content (determined by this method) should be included with each set of Unknowns. Controls should be run following the same procedure as for unknown.

### Results

Values are derived by the following equations:

$$1. \text{ Serum Triglyceride (mg/dL)} = \frac{\text{Au}}{\text{As}} \times 200$$

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:

$$2. \text{ Serum Triglycerides (mg/dL)} = \frac{\text{Au} - \text{Asb}}{\text{As}} \times 200.$$

NOTE: Samples having triglyceride values greater than 1000 mg/dL are diluted 5-fold (1 + 4) with normal saline (sodium chloride, 8.5 g/L), the assay repeated and results multiplied by the dilution factor of 5.

### Expected Values<sup>4</sup>

30 – 150 mg/dL

It is recommended that each laboratory establish its own normal range of expected values, since differences exist between instruments, laboratories, and local populations.

### Performance Characteristics<sup>5</sup>

**Reproducibility:** A study was performed on a control serum (mean = 57 mg/dL) and a patient pool (mean = 327 mg/dL) which entailed 10 determinations on each for 5 successive days. Coefficients of variation (CV) were within run 1.18% and 0.88% and between runs 1.96% and 0.88%, respectively.

**Correlation:** Determination of triglyceride levels by the procedure described (y) and by the GPO method of Boehringer Mannheim (x) on 57 sera (range 47 to 950 mg/dL) showed a correlation coefficient (r) of .999 and a regression equation of  $y = 1.029x - 7.46$ .

**Linearity:** When performed as directed the method is linear from 0 to 1000 mg/dL.

### References

- Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS: New Engl J Med 276:34, 1967
- Dryer RL: IN Fundamentals of Clinical Chemistry. NW Teitz, Ed. WB Saunders, Philadelphia, 1970, p329.
- Wahlefeld, AW: IN Methods of Enzymatic Analysis, Vol 5, HU Bergmeyer, Ed. Academic Press, New York, 1974, pp 1831-1835.
- Scheletter G, Nussel E: Arbeitsmed Sozialmed Pracentimed 10:25, 1975
- Stanbio Laboratory data

STANBIO LABORATORY, LP DISCLAIMS ALL EXPRESS AND IMPLIED WARRANTIES OF THE MERCHANTABILITY AND FITNESS PERTAINING TO THIS PRODUCT WHICH ARE NOT EXPRESSLY DETAILED IN THIS PACKAGING INFORMATION OR A WRITTEN AGREEMENT BETWEEN THE BUYER AND SELLER OF THIS PRODUCT.

STANBIO LABORATORY, LP MAINTAINS THAT THIS PRODUCT CONFORMS TO THE INFORMATION CONTAINED IN THIS INSERT. PURCHASER MUST DETERMINE THE SUITABILITY OF THE PRODUCT FOR ITS PARTICULAR USE. USE ONLY IN ACCORDANCE WITH LABELING INSTRUCTIONS.

For Technical Service call: 800-531-5535 • (830) 249-0772

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

<http://www.stanbio.com>

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

DN: RBR.2200.CE.EN.00-M • Last Revision: 09/05 • Procedure No. 2200



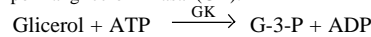
## Stanbio LiquiColor® Triglicéridos Proced. No. 2200

Para la determinación colorimétrica cuantitativa enzimática de Triglicéridos en suero ó plasma

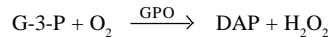
### Agente de Diagnóstico Resúmen y Principio

Para establecer el diagnóstico de hiperlipoproteinemia primaria o secundaria, es muy útil la cuantificación de triglicéridos en conjunto con otros lípidos. También es útil para dar seguimiento a la diabetes mellitus, nefrosis, obstrucción biliar y varias anomalías metabólicas que resultan de disturbios endócrinos.<sup>1, 2, 3</sup>

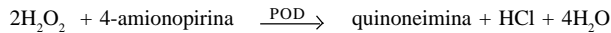
1. El glicerol y los ácidos grasos se forman en una primera etapa por la acción de la lipasa sobre los triglicéridos.
2. El glicerol se fosforila por la adenosin-5-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3-fosfato (G-3-P) y adenosin 5-difosfato (ADP) para producir glicerol-3-fosfato (G-3-P) y adenosin 5-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol-kinasa (GK).



3. La G-3-P es oxidada por la gliceril fosfato oxidasa (GPO) produciendo deshidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno.



4. Los peróxidos reaccionan con 4-aminoantipirina y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa (POD) para formar quinoneimina.



El factor aclarador lipemico (LCF) es una mezcla de aditivos especialmente diseñado por Stanbio integrados dentro del reactivo de triglicéridos para ayudar a minimizar las interferencias debidas a la lipemia.

### Reactivos

#### Triglicéridos Reactivo LiquiColor®, Cat. No. 2201

El reactivo contiene lo siguiente:

4-aminoantipirina .....	0.5 mmol/L
4-clorofenol .....	4.0 mmol/L
ATP .....	2.0 mmol/L
Lipasas .....	> 4.0 U/mL
Glicerol-kinasa .....	> 0.4 U/mL
Glicerol-3-fosfato oxidasa .....	> 1.5 U/mL
Peroxidasa .....	> 2.0 U/mL
Solución buffer (pH 6.7 ± 0.1.) .....	50 mmol/L

#### Estandar Triglicéridos (200 mg/dL), Cat. No. 2103

Contiene glicerol (20.8 mg/dL), equivalente a 200 mg/dL de trioleína más estabilizador y preservativo.

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

El reactivo y el estandar contienen azida de sodio como conservador. Puede reaccionar con cobre o plomo formando azidas metálicas explosivas. Para desecharlo enjuague con mucha agua para prevenir su formación.

**Preparación del Reactivo:** 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. Ponga el reactivo y el estandar a temperatura ambiente antes de usar.

### Materiales Requeridos Pero No Incluido

Espectrofotómetro para leer absorbancia de 500 nm (492-530 nm)

Parilla o baño de agua a 37°C (opcional)

Celdillas

Mixer (tipo Vortex)

Cronómetro

### Recolección y Preparación de la Muestra

**Estabilidad de la Muestra:** La heparina y el EDTA son los anticoagulantes de elección. No deben usarse fluoruros ni oxalatos. Separar inmediatamente el suero o el plasma. Los triglicéridos son estables por 10 días según reportes, a 2-8°C. No deje las muestras a temperatura ambiente (15-30°C) ya que los fosfolípidos pueden hidrolizarse liberando glicerol libre, falseando los resultados a niveles altos de triglicéridos.

**Sustancias Interferentes:** Para la recolección de sangre no debe usarse material que contenga glicerina (glicerol), tales como los que llevan un tapón lubricado. Valores altos de bilirrubina o muestra hemolizada, darán valores altos falsos. Varias drogas y otras sustancias afectan la determinación de los triglicéridos.

La interferencia de muestras ictericas o muy hemolizadas puede corregirse 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 .....	Creciente
Temperatura de reacción .....	37°C
Relación de muestra/reactivo .....	1:100
Tiempo de equilibrio .....	3 segundos
Tiempo de lectura .....	4 segundos
Tiempo lag .....	300 segundos
Absorbancia límite del blanco .....	0.500A
Máxima absorbancia .....	2.000 A
Estandar .....	200 mg/dL
Valor normal bajo .....	30 mg/dL
Valor normal alto .....	150 mg/dL
Linealidad .....	1000 mg/dL

Estos parámetros deben considerarse al programar el analizador automático de triglicéridos. Consulte su manual para instrucciones de programación.

### Procedimiento Manual

1. Pipetea en 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 si el instrumento requiere más de 1.0 mL.

2. Incube todas las celdillas por 5 minutos a 37°C, o a temperatura ambiente por 10 minutos.
3. Lea S y U contra RB a 500 nm antes de 60 minutos.

**Control de Calidad:** En suero normal y anormal con niveles de triglicéridos terminados por este método deberán incluirse con cada serie de ensayos.

### Resultado

Los valores se derivan de la siguiente ecuación:

$$\text{Triglicéridos séricos (mg/dL)} = \frac{\text{Au}}{\text{As}} \times 200$$

Donde Au y As son los valores de absorbancia de la muestra y del estandar respectivamente, 200 es la concentración del estandar (mg/dL).

Cuando se requiera un blanco de suero (ictérico o hemolizado), identifique otro tubo SB. Añada 1.0 mL de sol. salina "normal", 0.01 mL de suero y mezcle bien por inversión, transfiera a celdillas y lea la absorbancia (Abs) contra agua destilada a 500 nm. Use estos valores para corregir los desconocidos como sigue:

$$2. \quad \text{Triglicéridos séricos (mg/dL)} = \frac{\text{Au} - \text{Abs}}{\text{As}} \times 200$$

**NOTA:** Las muestras con valores de triglicéridos mayores a 1000 mg/dL deben diluirse 5 veces (1+4) con solución salina normal (cloruro de sodio 8.5 g/L). El análisis se repite y el resultado se multiplica por 5.

### Valores Esperados<sup>4</sup>

30-150 mg/dL

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propias valores ya que existen diferencias en los instrumentos, laboratorios, y en la población local.

### Características<sup>5</sup>

**Reproducibilidad:** Se realizó un estudio en un suero control (media = 57 mg/dL) y en un pool de pacientes (media = 327 mg/dL), realizándose 10 determinaciones en 5 días consecutivos. El coeficiente de variación (CV) intraensayo fué de 1.18% y 0.88% y el intraensayo de 1.96% y 0.88% respectivamente.

**Correlación:** La determinación de triglicéridos por éste método (y) y por el GPO de Boeringer Mannheim (x) en sueros (rango 47 a 950 mg/dL) mostraron un coeficiente de correlación (r) de 0.999 y una pendiente de y = 1.029 x 7.46.

**Linealidad:** El método es lineal hasta 1000 mg/dL.

### Referencias

1. Fredrickson DS, Levy RI, Less RS: New Engl J Med 276:34, 1967.
2. Dryer RL: IN Fundamentals of Clinical Chemistry. NW Tietz, Ed. WB Saunders, Philadelphia, 1970, p 329.
3. Wahlefeld AW: IN Methods of Enzymatic Analysis, Vol 5, HU Bergmeyer, Ed. Academic Press, New York, 1974, pp 1831-1835.
4. Scheletter G. Nussel E: Arbeitsmed Sozialmed Praventimed 10:25, 1975.
5. Stanbio Laboratory data.

STANBIO LABORATORY, LP DECLINA TODAS LAS GARANTIAS EXPRESADAS E INVOLUCRADAS EN LA NEGOCIABILIDAD Y PROPIEDAD CONCERNIENTE A ESTE PRODUCTO, QUE NO ESTEN EXPRESAMENTE DETALLADAS EN LA INFORMACION CONTENIDA EN EL EMPAQUE O SI NO HAY UN ACUERDO ESCRITO ENTRE EL COMPRADOR Y EL VENDEDOR DE ESTE PRODUCTO.

STANBIO LABORATORY, LP SOSTIENE QUE ESTE PRODUCTO CUMPLE CON LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTE INSERTO. EL COMPRADOR DEBE DETERMINAR LA CONFORMIDAD DEL PRODUCTO PARA SU USO PARTICULAR. USE SOLO DE ACUERDO A LAS INSTRUCCIONES DE LA ETIQUETA.

Para asistencia tecnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772

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

http://www.stanbio.com

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

DN: RBR.2200.CE.EN.00-M • Ultima Revisión: 09/05 • Proced No. 2200