

Phosphorus

Phosphomolybdate. Colorimetric

Quantitative determination of phosphorus IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Inorganic phosphorus reacts with molybdic acid forming a phosphomolybdic complex. Its subsequent reduction in alkaline medium originates a blue molybdenum colour.

The intensity of the color formed is proportional to the inorganic phosphorus concentration in the sample^{1,2}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Phosphorus is an essential mineral for tissue bone formation and is required by every cell in the body for normal function. Approximately 85% of the body phosphorus is found in bone and in teeth.

Low levels of phosphorus, can be caused by hypervitaminosis D, primary hyperparathyroidism, renal tubular disorders, antacids or malabsorption.

High levels of phosphorus can be caused by diet, bone metastases, liver disease, alcohol ingestion, diarrhea and vomiting^{1,5,6}.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R 1 Molybdic	Molybdate-Borate Sulphuric acid (H ₂ SO ₄)	1.21 mmol/L 100 mmol/L
R 2 Catalyzer	1,2 Phenylenediamine	2.59 mmol/L
PHOSPHORUS CAL	Phosphorus aqueous primary standard 5 mg/dL	

PRECAUTIONS

R1/RT: Corrosive (C); R35: Causes severe burns.

S24: Avoid contact with the skin. S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. S30: Never add water to this product. S45: In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.

PREPARATION

Working reagent (WR):

Mix equal volumes of R 1 (Molybdic) and R 2 (Catalyzer)

Stability: 10 h at 2-8°C, protected from light.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 710 nm \geq 0.40.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 710 nm.
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment^(Note 1).

SAMPLES

- Serum¹:

Free of hemolysis. Serum should be removed from the clot as quickly as possible to avoid elevation of serum phosphorus from hydrolysis or leakage of phosphate present in erythrocytes.

Stability: 7 days at 2-8°C.

- Urine^{1,2} (24 h):

Collect the specimen into a bottle containing 10 mL of 10% v/v hydrochloric acid (HCl) to avoid phosphate precipitations. Adjust to pH 2. Dilute the sample 1/10 with distilled water. Mix. Multiply the result by 10 (dilution factor). Stability: 10 days at 2-8°C.

PROCEDURE

1. Assay conditions:

- Wavelength: 710 nm (620-750)
 Cuvette: 1 cm. light path
 Temperature 37°C / 15-25°C
2. Adjust the instrument to zero with distilled water.
3. Pipette into a cuvette:

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	1.5	1.5	1.5
Standard ^(Note 2-3) (μL)	--	50	--
Sample (μL)	--	--	50

- Mix and incubate for 10 min at 37°C or 30 min at room temperature (15-30°C).
- Read the absorbance (A) of the samples and calibrator, against the Blank. The colour is stable for at least 2 hours.

CALCULATIONS

Serum

$$\frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Calibrator}} \times 5 \text{ (Calibrator conc.)} = \text{mg/dL of phosphorus in the sample}$$

Urine 24 h

$$\frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Calibrator}} \times 5 \times \text{vol. (dL) urine 24 h} = \text{mg/24 h of phosphorus}$$

Conversion factor: mg/dL x 0.323 = mmol/L.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINTROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES¹

Serum:

Children	: 4.0 - 7.0 mg/dL	(1.3 - 2.2 mmol/L)
Adults	: 2.5 - 5.0 mg/dL	(0.8 - 1.8 mmol/L)

Urine: 300 - 1000 mg/24 horas (10 - 33 mmol/24h)

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From *detection limit* of 0,008 mg/dL to *linearity limit* of 15 mg/dL.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
Mean (mg/dL)	3.64	6.25	3.72	6.17
SD	0.05	0.04	0.22	0.03
CV (%)	1.28	0.69	5.99	0.56

Sensitivity: 1 mg/dL = 0.104 A.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r): 0.9928

Regression equation: y=99782x + 0.0329

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

No interferences were observed with bilirubin up to 20 mg/dL, hemoglobin up to 150 mg/dL and ascorbic acid up to 30 mg/dL¹.

A list of drugs and other interfering substances with phosphorus determination has been reported by Young et. al^{3,4}.

NOTES

- PHOSPHORUS CAL: Proceed carefully with this product because due its nature it can get contaminated easily.
- Most of the detergents and water softening products used in the laboratories contain chelating agents and phosphates. It is recommended to rinse glassware in diluted nitric acid and water before using.
- Calibration with the aqueous standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

BIBLIOGRAPHY

- Farrell E C. Phosphorus. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1072-1074 and 418.
- Daly J A. et al. Clin Chem 1972; 18 (3): 263-265.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACC 1995.

PACKAGING

Ref: 1001150

Cont.

R1:1 x 150 mL, R2: 1 x 150 mL, CAL: 1 x 5 mL

Determinación cuantitativa de fósforo
IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

El fósforo inorgánico reacciona con el ácido molibdico formando un complejo fosfomolibdico. La subsiguiente reducción del complejo en medio alcalino origina una coloración de azul de molibdeno. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de fósforo inorgánico presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLINICO

El fósforo, es esencial para la formación del tejido óseo y el metabolismo energético celular. Aproximadamente un 85% se encuentra en el hueso y en los dientes. Niveles bajos de fósforo pueden ser debidos a hipervitaminosis D, hipertiroidismo primario, desordenes renales, ingestión de antiácidos o mala absorción.

Niveles altos son atribuidos a la dieta, metástasis de huesos, alteraciones en el hígado, alcoholismo, diarreas y vómitos^{1,5,6}.

El diagnostico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 Molibdico	Molibdato – Borato Acido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	1,21 mmol/L 100 mmol/L
R 2 Catalizador	1,2 Fenilendiamina	2,59 mmol/L
PHOSPHORUS CAL	Patrón primario acuoso de Fósforo 5 mg/dL	

PRECAUCIONES

R1/RT: Corrosivo (C). R35: Provoca quemaduras graves.

S24: Evítase el contacto con la piel. S26: En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acudir a un médico. S30: No echar jamás agua a este producto. S45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico.

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT):

Mezclar volúmenes iguales de R 1 (Molibdico) y R 2 (Catalizador).

Estabilidad: 10 h a 2-8°C, protegido de la luz.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 710 nm \geq 0,40.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro ó analizador para lecturas a 710 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio^(Nota 1).

MUESTRAS

- Suero¹:

Libre de hemólisis. El suero debe separarse lo antes posible de los eritrocitos con el fin de evitar la liberación de fósforo de los hematies. Estabilidad: 7 días a 2-8°C.

- Orina^{1,2} (24 h):

Recoger la orina en recipientes conteniendo 10 mL de ácido clorhídrico (ClH) al 10% (v/v) para evitar la precipitación de fosfatos. Ajustar a pH 2.

Diluir la muestra 1/10 con agua destilada. Mezclar. Multiplicar el resultado por 10 (factor de dilución). Estabilidad: 10 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 710 nm (620-750)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,5	1,5	1,5
Patrón ^(Nota 2-3) (µL)	--	50	--
Muestra (µL)	--	--	50

- Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C o 30 min a temperatura ambiente (15-30°C).
- Leer la absorbancia (A) del calibrador y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 2 horas.

CALCULOS

Suero

$$\frac{(A)Muestra}{(A)Calibrador} \times 5 \text{ (Conc. Calibrador)} = \text{mg/dL de fósforo en la muestra}$$

Orina 24 h

$$\frac{(A)Muestra}{(A)Calibrador} \times 5 \text{ x vol. (dL) orina/24h} = \text{mg/24 h de fósforo en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,323= mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero:

Niños : 4,0 - 7,0 mg/dL (1,3 - 2,2 mmol/L)

Adultos : 2,5 - 5,0 mg/dL (0,8 - 1,8 mmol/L)

Orina: 300 - 1000 mg/24 horas (10 - 33 mmol/24h)

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el *limite de detección* de 0,008 mg/dL hasta el *limite de linealidad* de 15 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al limite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (mg/dL)	3,64	6,25	3,72	6,17
SD	0,05	0,04	0,22	0,03
CV (%)	1,28	0,69	5,99	0,56

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,104 A.

Exactitud: Los reactivos de SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0.9928

Ecuación de la recta de regresión: $y=0.9982x + 0.0329$

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con bilirrubina hasta 20 mg/dL, hemoglobina hasta 150 mg/dL y ácido ascórbico hasta 30 mg/dL^{1,2}.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del fosforo^{3,4}.

NOTAS

- PHOSPHORUS CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- La mayoría de detergentes utilizados para el lavado de material contienen quelantes y fosfatos que interfieren en el ensayo. Se recomienda limpiar el material con ácido nítrico diluido y enjuagar abundantemente con agua desionizada.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFIA

- Farrell E C. Phosphorus. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1072-1074 and 418.
- Daly J A. et al. Clin Chem 1972; 18 (3): 263-265.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001150

Cont.

R1:1 x 150 mL, R2: 1 x 150 mL, CAL: 1 x 5 mL