



## Stanbio Total Calcium LiquiColor® (Arsenazo III) Procedure No. 0155

For the Quantitative Colorimetric determination of Total Calcium in serum.

### Summary and Principle

Calcium measurements are used in the diagnosis and treatment of parathyroid disease, a variety of bone diseases, chronic renal disease and tetany (intermittent muscular contractions or spasma).

Accurate and precise measurement of calcium in biological fluids has traditionally been difficult<sup>1</sup>. Atomic absorption spectrophotometry (AAS) and the spectrophotometric measurement of calcium-dye complexes such as o-cresolphthalein complexone (CPC) are most often used for measuring total calcium. Variations of the latter method have been applied to automated analyzers.

The Stanbio method for the determination of calcium presented here uses Arsenazo III (3,6-bis[(2-Arsonophenyl) Azo]-4,5-dihydroxy-2, 7-naphthalenedisulfonic acid)<sup>2</sup>; CAS registry number: 1668-00-4. Arsenazo III is chemically stable and has a very high affinity for calcium in a neutral pH range. In this assay system, the Arsenazo III forms a 1:1 violet Arsenazo III: calcium complex with an absorbance maximum at 650 nm<sup>3</sup>. The concentration of calcium is proportional to the absorbance of the violet colored Arsenazo III: calcium complex. The color produced by this complex is stable for at least 30 minutes at room temperature (15 - 30°C).

Magnesium does not interfere in this assay system. The affinity of Arsenazo III for magnesium is essentially zero at the pH at which the assay is performed<sup>4</sup>.

### Reagents

#### Calcium Color Reagent, Cat. No. 0156

Buffered solution, 100 mmol/L, with Arsenazo III, 0.15 mmol/L, non-reactive stabilizers and surfactant.

#### Calcium Standard (10 mg/dL), Cat. No. 0157

Calcium carbonate in dilute hydrochloric acid.

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

Do not pipet Color Reagent by mouth. Do not ingest. Organic arsenic compounds have been classified as potentially carcinogenic: therefore, safe laboratory practices should be carefully observed. Components of the reagent may be irritating to the skin and mucous membranes; avoid contact. If contact occurs, wash with copious amounts of water.

A major source of difficulty with the assay of calcium is contaminated glassware employed in the performance of the test. Many detergents and water supplies contain calcium and incompletely rinsed containers used in the test will lead to inaccurate results.

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

**Reagent Storage and Stability:** The reagent and standard are stable until their respective expiration dates when stored at room temperature (15 - 30°C). Reagent absorbance greater than 0.500 at 650 nm, when read against water, indicates deterioration and should therefore not be used.

### Materials Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance readings at 650 nm  
Accurate pipetting devices  
Cuvets Vortex type mixer Timer

### Specimen Collection and Preparation

Clear, unhemolyzed serum is the preferred specimen. The specimen should be collected following the guidelines of NCCLS document H4-H3.<sup>5</sup> Heparinized plasma must not be used. Plasma prepared using EDTA, oxalate, citrate, which function by removal of calcium, obviously must not be used.

**Sample Stability:** Calcium is stable in serum for up to 24 hours at room temperature, approximately 1 week at 2-8°C, and for up to 1 year frozen at -20°C.<sup>6</sup> Specimens showing a precipitate should not be used, as calcium may have combined with fatty acids or proteins.

**Interfering Substances:** Contaminated glassware is the greatest source of error. All glassware should be washed in warm 20% nitric acid, rinsed well with distilled or deionized water, dried and stored in a dust-free area. Young et al.<sup>7</sup> have published a comprehensive list of drugs and substances which may interfere with in vitro diagnostic assays, including that for serum calcium. Interference from lipemia is minimized because of the small amount of sample used.

### Automated Analyzer

#### Parameters:

Wavelength.....	650 nm
Reaction Type.....	Endpoint
Reaction Direction.....	Increasing
Reaction Temperature.....	37°C
Sample/Reagent Ratio.....	1:100
Incubation Time.....	60 second
Blank Absorbance Limit.....	0.500 A
High Absorbance.....	2.000 A
Standard.....	10 mg/dL
Low Normal.....	8.5 mg/dL
High Normal.....	10.5 mg/dL
Linearity.....	15 mg/dL

Parameters should be employed in programming automated analyzers for Total Calcium. Consult your instrument manual for programming instructions. For a specific instrument application contact Stanbio's Customer Service Department.

### Manual Procedure

- Pipet into appropriately labelled cuvettes the following volumes (mL) and mix well: **Incubate for at least 60 seconds.**

	Reagent Blank (RB)	Standard (S)	Unknown (U)
Color Reagent	1.0	1.0	1.0
Specimen	—	—	0.01
Standard, (10 mg/dL)	—	0.01	—

- Read absorbance (A) of S and U against the RB at 650 nm. Final color is stable for at least 30 minutes.

NOTE: Volumes may be doubled if the instrument requires volumes greater than 1.0 mL.

**Quality Control:** Serum controls are recommended to monitor the performance of the manual and automated assay procedures, providing a continued screening of the instrument, reagents and techniques. Stanbio Ser-T-FY® I (Normal) and Ser-T-Fy® II (Abnormal) controls are commercially available for this use.

### Results

Results are derived by the following equation:

$$\text{Serum Calcium (mg/dL)} = \frac{\text{Au}}{\text{As}} \times 10$$

where **Au** and **As** are absorbance values of **Unknown** and **Standard**, respectively, 10 is the concentration of the **Standard**.

**Example:** Absorbance values of a serum sample was 0.581 and that of the standard was 0.645. Therefore :

$$\text{Serum Calcium (mg/dL)} = \frac{0.581}{0.645} \times 10 = 9.0 \text{ mg/dL}$$

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

Normal Range: Serum 8.5 - 10.5 mg/dL (2.1 - 2.6 mmol/L)

### Performance Characteristics<sup>4</sup>

**Precision:** Within-run precision was established by 9 assays on three different levels of serum specimens. Total Precision values were obtained by assaying the 3 same serum specimens for 5 consecutive days:

	Within-Run		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean	6.8	12.9	21.8
Std. Deviation	0.005	0.117	0.13
C.V. (%)	0.07	0.9	0.7

	Total Precision		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean	6.8	12.9	21.8
Std. Deviation	0.08	0.10	0.18
C.V. (%)	1.2	0.7	0.8

**Correlation:** Employing a Calcium o-Cresolphthalein as a reference method, 72 serum specimens ranging from 6.0 mg/dL to 18.0 mg/dL were assayed. The correlation coefficient was 0.998 and the regression equation was  $y = 0.99984x + 0.043$

**Sensitivity:** Using a 1:100 sample to reagent ratio and reading at 650 nm, a 1 mg/dL calcium sample will produce a net absorbance of approximately 0.065.

**Linearity:** This procedure is linear up to 15 mg/dL.

### References

- Teitz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Co. (1986), pp. 1342.
- Bauer, P.J., Anal. Biochem. 110, 61-72, 1981
- Michaylova, V., and Ilkova, P., Anal Chim Acta 53, 194-198, 1971
- Stanbio Data
- NCCLS Document H4-H3, 3rd Ed. (1991)
- Tietz, N.W., editor, Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd. Ed., Saunders Co., 1987.
- Young, D.S., Pestaner, L.S. and Gibberman, V., Clin. Chem. 21. 1975.
- Kaplan, L.A., Pesce, A.J., Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation, C.V. Mosby Co., St. Louis, 1984.

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.0155.CE.EN.00-M • Last Revision: 08/05 • Procedure No. 0155



## Stanbio LiquiColor® Calcio Arsenazo III Proced. No. 0155

Para la determinación cuantitativa colorimétrica de Calcio en suero

### Agente de Diagnóstico Resumen y Principio

La determinación del calcio es usada en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades de la paratiroides y en variedad de enfermedades de los huesos, enfermedades crónicas renales t Tétano. (Concentraciones musculares intermitente o espasmos).

La medición precisa y exacta de calcio en los fluidos serológicos fue tradicionalmente muy difícil<sup>1</sup>. La medida de calcio por espectrofotometría de absorción atómica (AAS), la espectrofotometría y complejos colorados tales como O-cresolftaleina Complexone (CPC) son los más usados con frecuencia para la determinación del calcio total. Variaciones posteriores de los métodos pueden ser aplicadas a analizadores automatizados.

El método de Stanbio para la determinación del calcio presentado aquí usa Arsenazo III (3,6 Bis [(2-Arsenofenil) Azo]-4,5 dihidroxi-2,7 naphleedesulfinil acid<sup>2</sup>. Arsenazo III esquímicamente estable y tiene una afinidad por el calcio en un rango de pH neutral. En este sistema ensaya el Arsenazo III forma 1:1 Violeta Arsenazo III complejo de calcio con una absorbancia máxima a 650 nm<sup>3</sup>. La concentración de calcio es proporcional a la absorbancia coloreada Violeta Arsenazo III Complejo Calcio. El color producido es un complejo estable por 8 horas a temperatura ambiente (15-25°C). Magnesio no interfiere en este sistema de ensayo. La afinidad del Arsenazo III por magnesio es esencialmente cero<sup>2</sup>.

### Reactivos

#### Reactivo de Color para Calcio, Cat. No. 0156

Arsenazo III.....0.15 mmol/L  
Buffer ..... 100 mmol/L  
estabilizadores y preservativos

#### Estandar Calcio Total (10 mg/dL), Cat. No. 0157

Carbonato de calcio diluido en HCl

#### Precauciones: Para uso de diagnóstico "In Vitro".

1. No pipetear con la boca. No ingerir.
2. El arsénico es un compuesto orgánico clasificado como potencialmente carcinogénico, prácticas seguras de laboratorio deben cuidadosamente observadas.
3. Los componentes del reactivo pueden ser irritante en piel, membranas mucosas. Evitar el contacto, si el contacto ocurre debe ser lavado con abundantemente agua.

**Preparación del Reactivo:** El reactivo y el estandar están listos para usar.

**Estabilidad y Almacenamiento del Reactivo:** El reactivo y el estandar son estables a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas. Absorbancia del reactivo mayor de 0.500 a 650 nm leídas contra agua, indica deterioro del reactivo.

### Materiales Requeridos Pero No Incluidos

Espectrofotómetro para leer absorbancia de 650 nm  
Pipeteadores automáticos  
Celdillas (cubetas)  
Agitador Vortex  
Cronómetro

### Recolección y Preparación de la Muestra

Suero es la muestra de elección. Muestras hemolizadas no deben ser usadas. Plasma heparinizado no deben ser usados. Plasmas obtenidos usando EDTA, Oxalato, Citrato cuya función es remover el calcio, obviamente no deben ser usados. Separar el suero del coágulo antes de 2 horas.

**Estabilidad de Muestra:** La muestra de suero debe ser guardada en la nevera (2-8°C). Llevar a temperatura ambiente antes de usar. Muestra con precipitados no deben ser usado el calcio puede estar contaminado con ácidos grasos o proteínas.

**Substancias Interferentes:** La mayor fuente de error es el material de vidrio contaminado. Este material debe enjuagarse en ácido nítrico al 20% caliente, y se enjuaga después con agua destilada, se seca bien y se guarda en una área libre de polvo. Deben evitarse anticoagulantes que quelaten al calcio (oxalatos, EDTA, etc). Niveles altos de bilirrubina o hemoglobina pueden dar valores bajos falsos de calcio.

### Analizador Automatizado

#### Parámetros:

Longitud de onda ..... 650 nm  
Tipo de reacción ..... Punto final  
Dirección de la reacción ..... Incremento  
Temperatura de reacción ..... 37°C  
Relación muestra/reactivo ..... 1:100  
Tiempo de equilibrio ..... 4 segundos  
Tiempo de lectura ..... 3 segundos  
Tiempo de reacción ..... 60 segundos  
Absorbancia límite del blanco ..... 0.500 A  
Mayor absorbancia ..... 2.000 A  
Estandar ..... 10 mg/dL  
Linealidad ..... 15 mg/dL

Estos parámetros deben emplearse para programar el analizadores automáticos de Calcio Arsenazo III. Consulte su manual para instrucciones de programación.

### Procedimiento Manual

1. En celdillas identificadas apropiadamente, pipetee los siguientes volúmenes (mL) y mezcle bien:

	Reactivo Blanco (RB)	Estandar (S)	Muestra (U)
Estandar, 10 mg/dL	—	0.010	—
Muestra	—	—	0.010
Reactivo	1.0	1.0	1.0

**NOTA:** Los volúmenes pueden ser duplicados si el instrumento requiere volúmenes mayores de 1.0 mL.

2. Incubar a temperatura ambiente. La reacción es completada en 1 minuto.
3. Lea la absorbancia (A) de S y U contra el RB a 650 nm. El color es estable por 30 minutos..

**Control de Calidad:** En cada serie de muestras deben incluirse sueros control con valores conocidos de calcio total.

### Resultados

Los valores se derivan de la siguientes ecuación:

$$\text{Calcio en suero (mg/dL)} = \frac{\text{Au}}{\text{As}} \times 10$$

Donde Au y As son los valores de absorbancia de la muestra y del estandar respectivamente, 10 es la concentración del estandar.

**Ejemplo:** Valor de la absorbancia de la muestra de suero que es 0.581 y el estandar es 0.645 por consiguiente

$$\text{Calcio en suero (mg/dL)} = \frac{0.581}{0.645} \times 10 = 9.0 \text{ mg/dL}$$

### Valores Esperados<sup>7,8</sup>

Rango normal: Suero 8.5-10.5 mg/dL

### Características

**Correlación:** Empleando un calcio o aesoftaleina como un método de referencia, 72 muestras de sueros con una media de 6.0 mg/dL a 18 mg/dL fueron enrufados. El coeficiente de correlación fue 0.998 y la ecuación de regresión fue:  $y = 0.99984x + 0.043$ .

#### Precisión:

	Within-Run		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean	6.8	12.9	21.8
Std. Deviation	0.005	0.117	0.13
C.V. (%)	0.07	0.9	0.7

	Total Precision		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean	6.8	12.9	21.8
Std. Deviation	0.08	0.10	0.18
C.V. (%)	1.2	0.7	0.8

Linealidad: El ensayo es lineal hasta 15 mg/dL.

### Referencias

1. Teitz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Co. (1986), pp. 1342.
2. Bauer, P.J., Anal. Biochem. 110, 61-72, 1981
3. Michaylova, V., and Ilkova, P., Anal Chim Acta 53, 194-198, 1971
4. Stanbio Data
5. Young, D.S., Pestaner, L.S. and Gibberman, V., Clin. Chem. 21. 1975.
6. Todd, Sanford and Davidson, Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, W.B. Saunders Co., 1979.
7. Tietz, N.W., Clinical Guide to Laboratory Tests, p. 92, W.B. Saunders Co., 1983.
8. Hoffman, W.S., The Biochemistry of Clinical Medicine, 4th Ed., 548-613, Year Book Medical Publishers, Inc., 1970.

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. USELO SOLO DE ACUERDO A LAS INSTRUCCIONES DE LA ETIQUETA.

Para asistencia técnica 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.0155.CE.ES.00-M • Última Revisión: 08/05 • Proced No. 0155