



Evaluación de tres métodos de laboratorio para la cuantificación de hierro sérico y capacidad total de fijación al hierro*

EUGENIA MARÍA QUINTANA GUZMÁN¹ e ILEANA HOLST SCHUMACHER²

* Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

¹ Licenciada. Doctorado Profesional en Microbiología y Química Clínica y Especialidad Académica en Hematología.

² Licenciada. Doctorado Profesional en Microbiología y Química Clínica.

Resumen

Se evaluaron tres métodos de laboratorio para la determinación de hierro sérico (FeS) y capacidad total de fijación de hierro sérico (CTFFeS): el método de Beale (método de referencia) y un método comercial tanto con sus reactivos originales como con reactivos preparados en el laboratorio, con el fin de sustituir el método utilizado como referencia ya que es muy tedioso y consume mucho tiempo. Se realizaron los espectros de absorción, intervalos analíticos, estabilidad de los complejos coloreados, precisión en un mismo día y día a día durante 20 días consecutivos, recuperación, interferentes como hemoglobina, bilirrubina y cobre y un estudio de correlación entre estos métodos. Se concluye que a pesar de que el método de Beale no posee la mejor aplicabilidad analítica, sí presenta un desempeño analítico superior a los otros dos métodos evaluados, por lo tanto sigue siendo el método de elección para este medio.

Palabras clave: Hierro sérico * capacidad de fijación de hierro * anemia crónica * hemocromatosis * métodos.

Summary

Three laboratory methods for the analysis of serum iron (FeS) and iron binding capacity (CTFFeS) were evaluated: the Beale's method (reference method) and a commercial method using the original reagents as well as the reagents prepared in the laboratory in order to substitute the tedious and consuming time reference method. The absorption spectrum; analytical range; stability of the colored complex; accuracy day to day and within day; recovery analysis; interferences as hemoglobin, bilirubin and copper; and correlation study were realized to these methods. Although the Beale's method didn't have the best practicality characteristics it has a better analytical reliability than the other two methods. For that reason it is still the best alternative for the determination of serum iron and iron binding capacity in our laboratories.

Key words: Serum iron * iron binding capacity * chronic anaemia * haemochromatosis * methods.

ACTA

BIOQUIMICA

CLINICA

LATINOAMERICANA

Vol. XXX, Nº 4, 381-388, 1996.

Incorporada al Chemical

Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCIDL.

ISSN 0325-2957

Introducción

Las determinaciones de hierro sérico (FeS) y la capacidad total de fijación de hierro sérico (CTFFeS) se han convertido en pruebas indispensables para el diagnóstico de desórdenes hematológicos tales como deficiencia de hierro, siderosis, hemocromatosis y anemia crónica. También se utilizan en obstetricia, ginecología y pediatría (1) (2).

Hay más de 50 métodos descritos para la cuantificación de FeS (3-5), pero aún no existe un método de referencia aceptado universalmente (6). Estos métodos incluyen técnicas sofisticadas como la dilución de isótopos, inmunoprecipitación (7), inmunoelectroforesis y espectroscopia de absorción atómica (8), así como métodos automatizados (1) (3) (4) (9-16). Se han utilizado diferentes agentes reductores o cromógenos (9) (17-23). Sin embargo, el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH) ha recomendado el uso de ácido tioglicólico como agente reductor y batofenantrolina (24) o ferrozina como cromógenos (25).

En general, todos los procedimientos disponibles para la determinación de FeS tienen un uso clínico limitado dado su alto costo, falta de disponibilidad, grandes volúmenes de muestra requeridos (26), son tediosos, consumen mucho tiempo y demandan equipo especial de laboratorio (2) (3).

Para la determinación de la CTFFeS también se han sugerido muchas metodologías tales como la determinación química directa, la utilización de Fe radioactivo, la prueba no radioactiva con exceso de Fe removido con adsorbente (resina de intercambio iónico o carbonato de magnesio), la precipitación de la transferrina saturada con Fe y determinación de la CTFFeS, la espectroscopia de Absorción Atómica, o el uso de principios inmunológicos. No obstante, aún sigue vigente el problema relacionado con el establecimiento de un método de referencia para medir la CTFFeS (5). Según el ICSH el método que utiliza la adsorción de carbonato de magnesio no cumple con el criterio de un método de referencia debido a su gran variabilidad en precisión y exactitud (24) (27). La separación de la proteína unida al Fe del Fe libre y el establecimiento con exactitud del

grado de saturación ha sido un problema por años (3). Recientemente se ha recomendado el empleo de resinas de intercambio iónico (28).

El método comercial utiliza una solución amortiguadora de acetato pH 4,5, hidrocloreto de hidroxilamina como agente reductor, ferrozina como cromógeno, un único patrón de hierro con 5.000 µg/l y se introduce la incubación a 37 °C con las ventajas de que reduce el tiempo de reacción y omite la utilización de carbonato de magnesio (29).

El propósito de este trabajo es preparar en el laboratorio los reactivos utilizados en el método comercial y comparar este método con el método recomendado por la ICSH así como con el método comercial original, complejidad, tiempo, exactitud, precisión y correlación.

Materiales y métodos

Se utilizaron varias mezclas de suero provenientes de pacientes que acudieron a la donación en un banco de sangre. Para las pruebas de precisión se usaron tres mezclas de suero con concentraciones de hierro bajas, normales y altas. Para las pruebas de recuperación e interferencia se utilizó una mezcla de suero con concentración normal de hierro. El estudio de correlación entre los tres métodos se realizó con un total de 40 muestras de suero provenientes de estudiantes de secundaria.

Las mediciones fotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-160 con cubetas de plástico desechables. Toda la cristalería fue lavada y sumergida en ácido clorhídrico 12 M diluido 1:2 por 24 horas y luego enjuagada escrupulosamente con agua desionizada.

PROCEDIMIENTO

Se realizó el método descrito por Beale *et al.* modificado por Loria y Monge (5) como método de referencia; el método de la casa comercial Sigma Diagnostic según el procedimiento número 565 (29), y el método comercial pero con reactivos preparados en el laboratorio de la siguiente manera:

Solución de trabajo FeS: hidrocloreto de hidroxilamina al 1,5 % (P/V) en amortiguador de acetatos 0,44 mol/L pH 4,5.

Solución de trabajo CTFFeS: Tris aminometano 0,5 mol/L pH 8,1.

Reactivo de color: ferrozina al 0,85 % (P/V) en solución de hidrócloruro de hidroxilamina.

Patrón de hierro: 5.000 µg/l de hierro en solución de hidrócloruro de hidroxilamina.

A los tres métodos en investigación se les aplicó el protocolo de evaluación de métodos recomendado por Tietz (30) y la IFCC (31) que incluye el espectro de absorción, el intervalo analítico, la estabilidad del complejo coloreado, pruebas de precisión en un mismo día y día a día, pruebas de recuperación, pruebas de interferencia, coeficiente de correlación, ecuación de regresión lineal y error estándar.

solución patrón. Para el método de Beale se obtuvo un pico máximo de absorción entre los 530 y 540 nm. Con el método comercial, tanto con los reactivos originales como con los reactivos preparados en el laboratorio, se obtuvo un pico máximo de absorción a 560 nm.

INTERVALO ANALÍTICO

Al analizar el intervalo analítico obtenido con cada método se observó que en todos ellos, aún a una concentración de hierro de 8.000 µg/l, se mantuvo la linealidad.

ESTABILIDAD DEL PRODUCTO FINAL COLOREADO

La estabilidad del complejo coloreado se realizó con suero y con solución patrón para cada método, tanto para FeS como para CTFFeS. Con el método de Beale para FeS el patrón se estabilizó entre los 15 y los 55 minutos, tiempo a partir del cual comenzó a aumentar su absorbancia. El suero se estabilizó entre los 35 y 45 minutos aumentando también su absorbancia después de

Resultados

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL PRODUCTO FINAL COLOREADO

Se llevaron a cabo los espectros de absorción para cada método con suero y con

TABLA I.
IMPRECISIÓN DE LOS ANÁLISIS DE FeS Y CTFFeS EN UN MISMO DÍA.

	Mezcla de suero con concentración de FeS			Mezcla de suero con CTFFeS
	baja	normal	alta	normal
Método de Beale				
n	20	20	20	20
X (µg/l)	390	1.400	2.530	3.190
D.E. (µg/l)	31	32	54	109
C.V. (%)	7,9	2,3	2,1	3,4
Método Comercial				
n	20	20	20	20
X (µg/l)	400	1.170	2.540	2.600
D.E. (µg/l)	35	40	25	68
C.V. (%)	8,8	3,4	1,0	2,6
Métodos con reactivos preparados				
n	20	20	20	20
X (µg/l)	490	930	2.510	2.410
D.E. (µg/l)	33	30	44	119
C.V. (%)	6,7	3,2	1,8	4,9

D.E. = desviación estándar; X = promedio; C.V. = coeficiente de variación; n = número de análisis.

TABLA II.
IMPRECISIÓN DE LOS ANÁLISIS DE FeS Y CTFFeS DÍA A DÍA.

	Mezcla de suero con concentración de FeS			Mezcla de suero con CTFFeS
	baja	normal	alta	normal
Método de Beale				
n	20	20	20	20
X ($\mu\text{g/l}$)	360	1.340	2.610	3.280
D.E. ($\mu\text{g/l}$)	70	87	83	181
C.V. (%)	19,4	6,5	3,2	5,5
Método Comercial				
n	20	20	20	20
X ($\mu\text{g/l}$)	310	1.040	2.450	3.700
D.E. ($\mu\text{g/l}$)	43	45	47	40
C.V. (%)	13,9	4,3	1,9	1,1
Método con reactivos preparados				
n	20	20	20	20
X ($\mu\text{g/l}$)	280	950	2.410	3.480
D.E. ($\mu\text{g/l}$)	31	13	98	138
C.V. (%)	11,1	1,4	4,0	4,0

D.E. = desviación estándar; X = promedio; C.V. = coeficiente de variación; n = número de análisis.

este lapso. La CTFFeS en el suero se estabilizó desde el inicio de la reacción.

Con el método comercial para FeS el patrón se estabilizó entre 6 y 30 minutos, disminuyendo luego su absorbancia. El suero se estabilizó hasta los 45 minutos y luego de 1 hora y media disminuyó su absorbancia. El producto final coloreado para CTFFeS se estabilizó entre los 10 y 60 minutos.

Con el método comercial con reactivos preparados para FeS el suero se estabilizó entre los 10 y 30 minutos y con patrón entre los 7 y 30 minutos. La intensidad del color para la CTFFeS fue constante entre los 12 y 60 minutos.

IMPRECISIÓN DE LOS MÉTODOS

Las tablas I y II muestran los resultados de la precisión realizada a los tres métodos en un mismo día; y día a día respectivamente.

RECUPERACIÓN

En la tabla III se encuentran los valo-

res obtenidos de recuperación para cada método.

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

En la tabla IV se muestra el efecto producido por la interferencia de sustancias como bilirrubina, hemoglobina y cobre en los tres métodos bajo estudio.

ESTUDIO COMPARATIVO

El estudio de correlación se llevó a cabo obteniéndose la ecuación de regresión lineal, coeficiente de correlación (r) y el error estándar ($S_{y/x}$) entre el método de Beale y el método con reactivos preparados, entre el método comercial y el método con reactivos preparados y entre el método de Beale y el comercial, tanto para FeS como para CTFFeS.

Entre el método de Beale y el método con reactivos preparados se obtuvo para FeS un $r = 0,976$, una ecuación de regresión lineal de $y = -121,01 + 1,050 X$ y un $S_{y/x} = 180 \mu\text{g/l}$.

TABLA III.
RECUPERACIÓN DE HIERRO AGREGADO AL SUERO.

Cantidad de hierro agregado ($\mu\text{g/l}$)	% Recuperación		
	Método Beale	Método Comercial	Método con reactivos preparados
500	112	98	102
1.000	99	112	102
2.000	98	107	99
4.000	95	105	108
X	101	105	103

X = Promedio;

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Valor obtenido} - \text{Valor basal}}{\text{cantidad agregada}} \times 100$$

Para la CTFFeS el r fue de 0,729, la ecuación de regresión lineal $y = 766,59 + 0,387 X$ y el $S y/x = 766 \mu\text{g/l}$.

En la comparación entre el método comercial y el método con reactivos preparados para FeS se obtuvo un $r = 0,951$, una ecuación de regresión lineal $y = 67,4 + 0,835 X$ y un $S y/x = 104 \mu\text{g/l}$.

Para la CTFFeS el $r = 0,568$, la ecuación de regresión lineal $y = 1.060 + 0,8312 X$ y el $S y/x = 747 \mu\text{g/l}$.

Entre el método de Beale y el comercial para FeS el $r = 0,929$, la ecuación de regresión lineal $y = -93 + 0,914 X$ y el $S y/x = 44 \mu\text{g/l}$. Para la CTFFeS $r = 0,342$, la ecuación

de regresión lineal $y = 2.193 + 0,289 X$ y el $S y/x = 552 \mu\text{g/l}$.

Discusión y conclusiones

Según los espectros de absorción obtenidos con cada método, las longitudes de onda utilizadas en cada uno de ellos son las más apropiadas, a saber 535 nm para el método de Beale y 560 nm tanto para el método comercial como para el método en estudio.

Todos los métodos presentaron un intervalo analítico lineal aun hasta una concentración de 8.000 $\mu\text{g/l}$ de hierro.

TABLA IV.
ESPECIFICIDAD ANALÍTICA.

Interferente	Promedio % Interferencia		
	Método Beale	Método Comercial	Método con reactivos preparados
Hemoglobina (mg/l)	-0,006	0,002	0,005
Bilirrubina (mg/l)	-0,025	-0,071	-0,061
Cobre ($\mu\text{g/l}$)	-0,003	0,087	0,162

$$\% \text{ Interferencia} = \frac{(\text{Valor obtenido} \times 100) - 100}{\text{Valor basal}} \times \text{cantidad agregada}$$

En cuanto a los datos obtenidos sobre la estabilidad del compuesto coloreado se puede generalizar que los tiempos de incubación indicados en cada método son los óptimos. Para el método de Beale y según las modificaciones que se le han realizado (5) se debe incubar el FeS y la CTFFeS al menos 40 minutos. El plazo máximo para ambas determinaciones no deberá ser mayor a una hora. Los datos obtenidos con el método comercial indican que necesariamente se debe obtener la lectura para Fe y CTFFeS al tiempo exacto de 10 minutos después de agregado el cromógeno, tanto para la muestra como para el patrón. La misma situación se presenta para el método con reactivos preparados, el cual debe ser incubado por 10 minutos exactos. En caso de excederse el tiempo de lectura los valores de FeS y CTFFeS darán más altos de lo esperado.

Analizando los datos de precisión para FeS y CTFFeS (tablas I y II) se observa cómo los coeficientes de variación (CV) de los tres métodos evaluados son más altos cuando se realizan las pruebas día a día que cuando se hacen en un mismo día. Este hecho es de esperarse, ya que las variables involucradas en el análisis de las muestras en diferentes días son mayores (voltaje, hora de análisis, equipo, personal de laboratorio, etc.). Cabe destacar que los CV de los tres métodos en estudio son similares a concentraciones bajas, normales y altas de FeS, tanto en un mismo día como día a día. Fue a concentraciones bajas de FeS donde se obtuvieron los CV más altos en los tres métodos y las mejores precisiones se obtuvieron a concentraciones altas de FeS.

Con respecto a las pruebas de exactitud (Tabla III) el método de Beale presentó el mejor promedio de recuperación (101 %). Sin embargo, los tres métodos evaluados poseen una buena exactitud, ya que lo esperado es que el promedio de los porcentajes de recuperación no sea menor del 95 % ni mayor del 105 % (30).

En cuanto a las pruebas de interferencia (tabla IV), con el método de Beale se obtuvo una interferencia negativa para las tres sustancias evaluadas. Cada mg/l de Hb disminuye en un 0,006 % el valor de FeS obtenido, así como cada mg/l de bilirrubina lo disminuye en un 0,025 % y cada µg/l de cobre lo disminuye en un 0,003 %. En

el método comercial se observa cómo la Hb y el cobre producen interferencia positiva mientras que la bilirrubina produce interferencia negativa. Cada mg/l de Hb aumenta en un 0,002 % el valor de FeS obtenido, cada mg/l de bilirrubina disminuye en un 0,071 % este valor y cada µg/l de cobre lo aumenta en 0,087 %. El método con reactivos preparados presentó un comportamiento muy semejante al comercial en cuanto a interferentes. Cada mg/l de Hb aumenta en un 0,005 % el valor del FeS, cada mg/l de bilirrubina produce una disminución de 0,061 % y cada µg/l de cobre lo aumenta en 0,162 %. Por lo tanto el cobre es un interferente muy importante en la determinación de FeS cuando se utiliza ferrozina como agente cromógeno.

El estudio de correlación entre métodos señala coeficientes de correlación cercanos a 1,0 lo que indica una buena correlación entre estos métodos para FeS. Contrario a esto, los coeficientes de correlación para la CTFFeS son bajos: 0,342, 0,568 y 0,729.

Analizando el conjunto de datos anteriores se puede concluir que a pesar de que el método de Beale no posee la mejor aplicabilidad analítica desde el punto de vista de ser un método tedioso, que requiere de mucha muestra y largos períodos de incubación, sí presenta el mejor desempeño analítico entre los métodos evaluados en cuanto a exactitud y especificidad analítica.

Tanto el método comercial como el método con reactivos preparados presentan una aplicabilidad analítica superior al método de Beale pero no así en cuanto a desempeño analítico principalmente desde el punto de vista de interferentes y de la exactitud al no correlacionar la CTFFeS de estos métodos con el de referencia.

Por lo tanto el método de Beale sigue siendo el método de elección para realizar el análisis de FeS y CTFFeS en nuestro medio.

CORRESPONDENCIA

Lic. Eugenia Quintana y/o Lic. Ileana Holst
Facultad de Microbiología
Departamento de Análisis Clínicos
Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica
Fax: (506) 225-2374

Referencias bibliográficas

1. FRIEDMAN, H. and CHEEK, C., "Simultaneous and completely automated methods for serum iron and iron-binding capacity determination", *Clin. Chim. Acta*, 31, 315-327, 1971.
2. WILLIAMS, H.; ANDERSON, P.; CONRAD, M. and CROSBY, W., "A rapid method of measuring the iron concentration in serum or plasma", *J. Lab. Clin. Med.*, 63, 703-707, 1961.
3. VALCOUR, A.; KRZYMOWSKI, G.; ONOROSKI, M.; BOWERS, G. and MCCOMB, R., "Proposed reference method for iron in serum used to evaluate two automated iron methods", *Clin. Chem.*, 36, 1.789-1.792, 1990.
4. BROZOVIC, B. and PURCELL, Y., "An automated micromethod for measuring iron concentration in serum using thioglycollic acid and bathophenanthroline sulphionate", *J. Clin. Path.*, 27, 222-225, 1974.
5. SAENZ, G.; CHAVES, M.; ARROYO, G.; VALENCIANO, E.; JIMÉNEZ, J.; MONTERO, A. y QUINTANA, E., "Hierro sérico y transferrina funcional (capacidad total de fijación de hierro). Preconización de una metodología", *Rev. Cost. Cienc. Med.*, 6, 51-64, 1985.
6. MARTINEK, R., "Review of methods for determining iron and iron-binding capacity in biological materials", *J. Am. Med. Technol.*, 32, 582-589, 1970.
7. HUEBERS, H.; ENG, M.; JOSEPHSON, B.; EKPOOM, N.; RETTMER, R.; LABBÉ, R.; POOTRAKUL, P. and FINCH, C., "Plasma iron and transferrin iron-binding capacity evaluated by colorimetric and immunoprecipitation methods", *Clin. Chem.*, 33, 273-277, 1987.
8. ZETNER, A.; SYLVIA, L. and CAPACHO, L., "The determination of serum iron and iron-binding capacity by atomic absorption spectroscopy", *Am. J. Clin. Path.*, 45, 533-540, 1966.
9. YEE, H. and ZIN, A., "An Autoanalyzer procedure for serum iron and total iron-binding capacity, with use of ferrozine", *Clin. Chem.*, 17, 950-953, 1971.
10. WERKMAN, H.; TRJBELS, J.; VAN MUNSTER, P.; SCHRETTEN, E. and MOEKERK, C., "Automated determination of serum and ferrioxamine in urine", *Clin. Chim. Acta*, 31, 395-401, 1971.
11. WHITE, J. and FLASHKA, H., "An automated procedure with use of ferrozine for assay of serum iron and total iron-binding capacity", *Clin. Chem.*, 19, 526-528, 1973.
12. SCHOLSNAGLE, D.; HUTTON, P. and CONN, R., "Ferrozine assay of serum iron and total iron-binding capacity adapted to the COBAS BIO centrifugal analyzer to the Editor", *Clin. Chem.*, 28, 1.730-1.732, 1982.
13. FRAZER, C., "Problems in the determination of serum total iron-binding capacity. Letter to the Editor", *J. Clin. Path.*, 26, 457-458, 1973.
14. KLEIN, B.; KLEINMAN, N. and SEAVAY, R., "Application of Fe²⁺-5-pyridyl Benzodiazepin-2-ones to the automated determination of serum iron and iron-binding capacity". *Clin. Chem.*, 16, 495-499, 1970.
15. ZAK, B. and EPSTEIN, E., "Automated determination of serum iron", *Clin. Chem.*, 11, 641-644, 1965.
16. KUNESH, J. and SMALL, L., "Adaptation of the Zak-Epstein automated micromethod for serum iron to determine iron-binding capacity and urinary iron", *Clin. Chem.*, 16, 148-149, 1970.
17. PERSIJN, J.; VAN DER SLIK, W. and RIETHORST, A., "Determination of serum iron and latent iron-binding capacity (LIBC)", *Clin. Chim. Acta*, 35, 91-98, 1971.
18. HORAK, E.; HOHNADDEL, D. and SUNDERMAN, W., "Modified method for analysis of serum iron", *Ann. Clin. Lab. Sc.*, 5, 303-307, 1975.
19. NESS, A. and DICKERSON, H., "The determination of serum iron by nitroso-R-salt without deproteinization", *Clin. Chim. Acta*, 12, 579-588, 1965.
20. FORMAN, D., "Determination of iron in serum using solvent extraction", *Am. J. Clin. Path.*, 42, 103-108, 1964.
21. NOGUERA, J. y SÁENZ, G., "Hierro sérico y capacidad libre de fijación al suero en adultos normales", *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños*, 21, 23-24, 1967.
22. PETERS, T.; GIOVANNIELLO, T.; APT, L. and ROSS, J., "A simple improved method for the determination of serum iron II", *J. Lab. Clin. Med.*, 48, 280-288, 1956.
23. GOODWIN, J.; MURPHY, B. and GUILLEMETTE, M., "Direct measurement of serum iron and binding capacity", *Clin. Chem.*, 12, 47-57, 1966.
24. INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY, "The measurement of total and unsaturated iron-binding capacity in serum", *Brit. J. Haem.*, 38, 281-290, 1978.
25. INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY, "Recommendations for measurement of serum iron in human blood", *Brit. J. Haem.*, 38, 291-295, 1978.
26. WILLIAMS, H. and CONRAD, M., "A one-tube method for measuring the serum iron concentration and unsaturated iron-binding capacity", *J. Lab. Clin. Med.*, 67, 171-176, 1966.

27. LEGGATE, J. and CROOKS, A., "Problems in quality control in determinations of serum total iron-binding capacity by the magnesium carbonate method", *J. Clin. Path.*, 25, 905-906, 1972.
28. CHARAMZA, O., "The serum iron-binding capacity and some accuracy-conditions of its determination", *Acta Univ. Paolo*, 42, 181-188, 1966.
29. Sigma Diagnostics. Iron and total iron-binding capacity. (Colorimetric endpoint method). *Procedure N° 565*.
30. TIETZ, N. W., *Textbook of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
31. BUTNER, J.; BORTH, R.; BOUTWELL, J. H. and BROUGHTON, P. M. G., "Approved Recommendation on Quality Control in Clinical Chemistry. Part 2. Assessment of Analytical Methods for Routine Use", *Clin. Chim. Acta*, 98, F 145-F 162, 1979a.