

Comparación de aceites esenciales de *Matricaria recutita* L. de origen diverso

Comparison of essential oil content of Matricaria recutita L. from different origins

RAAL A,¹ ARAK E,¹ ORAV A,² IVASK K²

¹Departamento de Farmacia, Universidad de Tartu. c/ Jakobi 2, Tartu 51014, Estonia. E-mail: araal@ut.ee

²Instituto químico, Universidad Técnica de Tallinn. c/ Ehitajate tee 5, Tallinn 19086, Estonia.

E-mail: aorav@argus.chemnet.ee

Este trabajo ha sido financiado a través de la beca N° 4332 de la Fundación Científica de Estonia.

This work has been supported by the Estonian Scientific Foundation Grant No. 4332.

RESUMEN

En el presente trabajo se han determinado las variaciones en la composición de aceites esenciales de *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, especie cultivada en distintos países de Europa. Los aceites esenciales han sido extraídos de las muestras secas, con unos rendimientos de 3.6–6.6 mg/g y en ellos se han identificado 38 componentes, los cuales representan más del 95% del total del aceite esencial. El principal compuesto biológicamente activo en el aceite esencial de la manzanilla procedente de Gran Bretaña fue el óxido de β -bisabolol (25%); en los procedentes de Bélgica, Estonia y Francia predominaba el óxido de α -bisabolol (43–55%) y el compuesto principal en el de Hungría fue el α -bisabolol (24%). El (E)- β -farneseno se encontraba en sus mayores proporciones (5–7%) en los de Bélgica y Francia, mientras que el camazuleno representaba del 1 al 14% del total de los distintos aceites esenciales siendo más abundante en los aceites procedentes de Gran Bretaña (14%).

PALABRAS CLAVES: α -bisabolol. Óxido de α -bisabolol. Óxido de β -bisabolol. Camazuleno. Chamomilla recutita. Cis-en-dicicloéter. (E)- β -farneseno. Aceites esenciales. Manzanilla alemana. Manzanilla silvestre. Matricaria recutita. Camomila.

ABSTRACT

Variations in the essential oil content of Matricaria recutita L., cultivated in different European countries, were determined. The oil was obtained in yields of 3.6–6.6 mg/g from dried samples. 38 components were identified, representing over 95% of the total yield of oil. The principal biologically active compound in chamomile oil, of British origin, was bisabolol oxide B (25%). In oils from Belgium, Estonia and France, bisabolol oxide A (43–55%) was predominant, whereas in Hungarian oil the main compound was alpha-bisabolol (24%). (E)-beta-Farnesene content was predominant (5–7%) in oils from Belgium and France. Chamazulene was present in 1–14% of oils and its content was highest in oil of British origin (14%).

KEYWORD: Matricaria recutita L. Compositae. German chamomile. Essential oil composition. Bisabolol oxide A and B. Alpha-bisabolol. Cis-enyne-dicycloether. Chamazulene. (E)-beta-farnesene.

INTRODUCCIÓN

La manzanilla alemana (*Matricaria recutita* L., *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) es una planta herbácea medicinal que se cultiva en todo el mundo. Su aceite esencial (AE) se utiliza con relativa frecuencia en las industrias farmacéuti-

INTRODUCTION

Wild chamomile (*Matricaria recutita* L., *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) is cultivated all over the world as a herbaceous medicinal plant. Its essential oil is used rather widely in the pharmaceutical, cosmetic, and food indus-

cas, cosméticas y alimentarias. Hasta el momento presente, la composición del aceite esencial de la manzanilla ha sido el objeto de un reducido número de investigaciones.¹⁻⁹ Los principales compuestos biológicamente activos del AE de manzanilla son: óxidos de bisabolol, óxido de bisabolona, α -bisabolol, espatulenol, en-in-dicicloéter y camazuleno. En la manzanilla estudiada se encuentran determinados componentes antiinflamatorios y antiespasmódicos de entre los cuales los más importantes son derivados terpénicos: matricina, camazuleno, α -bisabolol y los óxidos α y β del α -bisabolol.¹⁰ Se han demostrado las acciones antiflogísticas de α -bisabolol, camazuleno y espiro éteres. El α -bisabolol y los espiro-éteres son componentes antibacterianos y fungicidas. Se ha comprobado además que el α -bisabolol ejerce una acción antiulcerosa y anti-séptica.¹¹⁻¹²

En el presente trabajo hemos determinado la composición de los aceites esenciales, utilizando muestras de manzanilla procedentes de distintos países europeos. El trabajo se ha centrado en la investigación de las variaciones del contenido de los componentes biológicamente activos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal (*flos Chamomillae* o *Matricariae flos* comerciales [en Farmacopea Europea¹³]) ha sido adquirido en farmacias de distintos países europeos durante los años 2000 (en Estonia y Francia) y 2001 (en Hungría y Bélgica). Las semillas de la manzanilla procedentes de Gran Bretaña (producto de CN Seeds) fueron cultivadas en el Jardín Experimental de la Universidad de Tartu a lo largo del verano de 2001. Las muestras comprobantes están depositadas en el Departamento de Farmacia de la Universidad de Tartu, Estonia.

El AE ha sido extraído a partir de material vegetal, una vez seco, por el método de destilación de la Farmacopea Europea¹³, empleando 30g de droga entera y 0.50 ml de xileno para obtener el AE. El tiempo de destilación fue de 4 horas a razón de 3-4 ml por minuto.

Los análisis de cromatografía gaseosa se han realizado utilizando un cromatógrafo Chrom 5, equipado con un detector de ionización de llama de dos columnas (50 m \pm 0.2 mm) capilares de sílice fundida, de fases estacionarias química-

tries. The composition of chamomile essential oil has been the subject of a limited number of research projects.¹⁻⁹ The main biologically active compounds in chamomile oil are bisabolol oxides, bisabolone oxide, alpha-bisabolol, spathylenol, enyne-dicycloether and chamazulene. The principal anti-inflammatory and antispasmodic constituents of chamomile are terpene compounds, matricin, chamazulene, alpha-bisabolol oxides A and B, and alpha-bisabolol.¹⁰ The antiphlogistic action of alpha-bisabolol, chamazulene and spiro-ethers has already been substantiated. Alpha-Bisabolol and spiro-ethers are among the antibacterial and fungicidal components. Alpha-Bisabolol has been shown to have an antiseptic and ulcer-protecting action.¹¹⁻¹²

In the present work we determined the composition of the essential oil using commercial chamomile samples from different European countries. The variations in the content of the biologically active constituents were studied.

MATERIAL AND METHODS

Plant material (commercial *flos Chamomillae* or *Matricariae flos* [in European Pharmacopoeia¹³]) were obtained from retail pharmacies from different European countries in 2000 (Estonia, France) and in 2001 (Hungary, Belgium). The chamomile seeds of British origin (Company *CN Seeds*) were cultivated in the Experimental Garden of the University of Tartu, in the summer of 2001. Voucher specimens have been deposited at the Department of Pharmacy, University of Tartu, Estonia.

The essential oil was isolated from dried plant material using the distillation method described in the European Pharmacopoeia¹³. 30g of whole drug and 0.50 ml of xylene were used to take up the essential oil. Distillation time was 4 h at a rate of 3-4 ml/min.

GC analysis was carried out using a Chrom 5 chromatograph with FID on two fused silica capillary columns (50m \pm 0.2mm) with bonded stationary phases NB-30 (film thickness 0.25 μ m) and SW 10 (film thickness 0.5 μ m). As carrier gas, helium with split ratio 1:150, flow rate 0.4 ml/min for NB-30 and 1.2 ml/min for SW 10 was applied. The temperature programming was from 50-250°C (NB-30) and 70-230°C (SW 10) at 2°C/min; injector temperature was 200°C. A

mente unidas NB-30 (espesor de película 0.25 µm) y SW 10 (espesor de película 0.5 µm). Como gas portador se ha utilizado helio con una proporción de división de 1:50 y con una velocidad de 0.4 ml/min para NB-30 y de 1.2 ml/min para SW 10. Respecto a la temperatura, se ha aplicado la siguiente programación: para NB-30 50-250 °C y para SW 10 70-230 °C a razón de 2 °C/min. El procesamiento de los datos se ha realizado mediante un integrador Hewlett-Packard modelo 3390A.

La identificación de los componentes del AE se ha basado en la comparación de sus índices de retención (IR) determinados en dos columnas, de datos procedentes de nuestra base de datos o de los existentes en bibliografía.¹⁴⁻¹⁷ Los resultados obtenidos han sido confirmados mediante cromatografía gaseosa - espectrometría de masas. Los porcentajes de compuestos individuales fueron calculados partiendo de las áreas de los picos, para lo cual se ha utilizado el método de normalización.

RESULTADOS

Las soluciones de aceite de manzanilla obtenidas en xileno mostraban un color azul. Los índices de retención de los componentes del AE en dos columnas de polaridad diferente, la composición porcentual de los AE de manzanillas procedentes de los citados países y los rendimientos en AE aparecen en la Tabla 1.

Hewlett-Packard Model 3390A integrator was used for data processing.

The identification of the oil components was based on a comparison of their retention indices (RI), determined on two columns with authentic data originating from our database or from previous literature.¹⁴⁻¹⁷ The results obtained were confirmed by GC/MS. The percentages of the individual compounds were calculated from the GC peak areas, using the normalisation method.

RESULTS AND DISCUSSION

The chamomile oil solutions obtained in xylene, gave off blue colouring (chamazulene). The RI values of the oil components on two columns of different polarity, the percentage composition of the oils from chamomile of five European countries, and the oil yields are presented in Table 1.

TABLA 1. Composición del aceite esencial de *Matricaria recutita* L. procedente de diferentes países.

Componente	RI		Concentración*, %				
	NB-30	SW-10	Est**	Fr	Hun	Bél	GB
α -pineno	932	1029	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3
sabineno	966	1125	0.2	0.1	0.5	0.4	0.3
mirreno	983	1161	ss.	ss.	0.3	0.3	0.2
3-octanol	989	1395	0.3	0.1	0.5	0.2	0.5
p-cimeno	1013	1270	0.1	0.3	0.4	0.5	0.7
1,8-cineola	1024	1211	0.2	0.1	ss.	0.4	0.7
(Z)- β -ocimeno	1028	1232	nd.	nd.	ss.	ss.	0.2
(E)- β -ocimeno	1040	1249	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6
artemisia cetona	1046	1348	0.8	0.5	0.8	1.2	1.8
γ -terpineno	1050	1246	0.2	0.1	0.3	0.2	0.3
artemisia alcohol	1074		0.4	0.4	0.3	0.2	0.5
linalool	1090	1545	nd.	nd.	0.2	0.2	0.1
camfor	1125	1511	nd.	nd.	0.4	0.2	-
borneol	1156	1693	nd.	nd.	0.3	0.3	0.2
p-cimen-8-ol	1162		nd.	nd.	0.2	nd.	0.2
α -terpineol	1177	1687	nd.	nd.	nd.	0.2	0.2
carvona	1220	1720	0.5	0.1	0.2	ss.	nd.
geranial	1256	1728	nd.	nd.	0.3	ss.	0.1
(E)-anetol	1264	1820	0.5	0.1	0.3	nd.	0.1
decanol	1280		0.7	0.1	2.5	0.2	ss.
ácido decanoico	1362	2270	0.8	3.0	5.6	0.3	1.2
(E)- β -cariofileno	1420	1587	0.1	ss.	0.1	ss.	0.1
alfa-bergamoteno	1426		nd.	ss.	0.1	0.3	0.1
(E)-β-farneseno	1450	1662	2.2	5.2	4.0	7.1	2.5
alo-aromadendreno	1460	1624	nd.	nd.	1.3	0.2	0.1
germacreno D	1478	1690	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2
biciclogermacreno	1485	1716	0.1	0.2	0.3	ss.	0.4
α -farneseno	1495	1740	0.3	0.2	1.0	0.2	0.2
β -bisaboleno	1500	1716	0.1	nd.	0.5	ss.	0.2
δ -cadineno	1516	1740	0.3	ss.	ss.	ss.	0.1
germacreno B	1550		0.3	0.1	0.1	0.1	0.2
espatulenol	1570	2100	2.2	1.8	3.9	1.4	2.8
óxido de β-bisabolol	1648	2115	15.6	6.2	12.2	5.7	24.8
óxido de α-bisabolona	1670	2158	5.2	6.0	3.1	4.1	3.7
α-bisabolol	1674	2200	0.5	2.6	23.6	1.2	0.4
camazuleno	1715	2370	2.5	3.1	4.8	1.2	13.8
óxido de α-bisabolol	1734	2400	43.2	54.6	12.6	47.3	19.7
cis-en-in-dicicloéter	1846		18.7	13.0	14.8	22.2	18.7
trans-en-in-dicicloéter	1918		0.3	0.4	0.3	0.3	0.3
Total			96.6	98.7	96.2	96.9	96.5
Rendimiento mg/g			6.0	4.2	4.7	6.3	6.6

ss. = señales (<0.05%)

nd. = no detectado

* determinado en la columna NB-30

** Est - Estonia, Fr - Francia, Hun - Hungría, Bél - Bélgica, GB - Gran Bretaña

TABLE 1. Composition of the essential oil from *Matricaria recutita* L. of different origins

Component	RI	Concentration*, %					
	NB-30	SW-10	Est**	Fr	Hun	Bél	GB
α -Pinene	932	1029	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3
Sabinene	966	1125	0.2	0.1	0.5	0.4	0.3
Myrcene	983	1161	ss.	ss.	0.3	0.3	0.2
3-Octanol	989	1395	0.3	0.1	0.5	0.2	0.5
p-Cymene	1013	1270	0.1	0.3	0.4	0.5	0.7
1,8-Cineole	1024	1211	0.2	0.1	ss.	0.4	0.7
(Z)- β -Ocimene	1028	1232	nd.	nd.	ss.	ss.	0.2
(E)- β -Ocimene	1040	1249	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6
Artemisia ketone	1046	1348	0.8	0.5	0.8	1.2	1.8
gamma-Terpinene	1050	1246	0.2	0.1	0.3	0.2	0.3
Artemisia alcohol	1074		0.4	0.4	0.3	0.2	0.5
Linalool	1090	1545	nd.	nd.	0.2	0.2	0.1
Camphor	1125	1511	nd.	nd.	0.4	0.2	-
Borneol	1156	1693	nd.	nd.	0.3	0.3	0.2
p-Cymen-8-ol	1162		nd.	nd.	0.2	nd.	0.2
α -Terpineol	1177	1687	nd.	nd.	nd.	0.2	0.2
Carvone	1220	1720	0.5	0.1	0.2	ss.	nd.
Geranial	1256	1728	nd.	nd.	0.3	ss.	0.1
(E)-Anethole	1264	1820	0.5	0.1	0.3	nd.	0.1
Decanol	1280		0.7	0.1	2.5	0.2	ss.
Decanoic acid	1362	2270	0.8	3.0	5.6	0.3	1.2
(E)-beta-Caryophyllene	1420	1587	0.1	ss.	0.1	ss.	0.1
alpha-Bergamotene	1426		nd.	ss.	0.1	0.3	0.1
(E)-beta-Farnesene	1450	1662	2.2	5.2	4.0	7.1	2.5
Alo-aromadendrene	1460	1624	nd.	nd.	1.3	0.2	0.1
Germacrene D	1478	1690	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2
Bicyclogermacrene	1485	1716	0.1	0.2	0.3	ss.	0.4
alpha-Farnesene	1495	1740	0.3	0.2	1.0	0.2	0.2
beta-Bisabolene	1500	1716	0.1	nd.	0.5	ss.	0.2
delta-Cadinene	1516	1740	0.3	ss.	ss.	ss.	0.1
Germacrene B	1550		0.3	0.1	0.1	0.1	0.2
Spathylenol	1570	2100	2.2	1.8	3.9	1.4	2.8
Bisabolol oxide B	1648	2115	15.6	6.2	12.2	5.7	24.8
Bisabolon oxide A	1670	2158	5.2	6.0	3.1	4.1	3.7
alpha-Bisabolol	1674	2200	0.5	2.6	23.6	1.2	0.4
Chamazulene	1715	2370	2.5	3.1	4.8	1.2	13.8
Bisabolol oxide A	1734	2400	43.2	54.6	12.6	47.3	19.7
cis-Enyne-dicycloether	1846		18.7	13.0	14.8	22.2	18.7
trans-Enyne-dicycloether	1918		0.3	0.4	0.3	0.3	0.3
Total			96.6	98.7	96.2	96.9	96.5
Yield mg/g			6.0	4.2	4.7	6.3	6.6

tr. = traces (<0.05%)

nd. = not detected

* determined on NB-30 column

** Est – Estonia, Fr – France, Hun – Hungary, Bel – Belgium, GB –Great Britain

Los rendimientos más altos (6.0-6.6 mg/g) en AE fueron obtenidos de la manzanilla de Gran Bretaña, cultivada en el Jardín Experimental de la Universidad de Tartu, y de la manzanilla de Bélgica y Estonia. El contenido más bajo (4.2-4.7) se halló en la manzanilla de Hungría y Francia.

El cotejo de la composición de los AE de manzanillas de muestras diferentes ha demostrado una alta variabilidad en las concentraciones de los distintos componentes y, principalmente, de los biológicamente activos. En el AE originario de las plantas obtenidas a partir de las semillas de Gran Bretaña el óxido de β -bisabolol representaba el 25% mientras que en el resto de las muestras estudiadas el valor oscilaba entre el 6% y el 16%. Los AE procedentes de Francia, Estonia y Bélgica mostraron un contenido más alto en óxido de α -bisabolol (43-55%) que las demás muestras (13-20%). El componente principal del AE de la manzanilla de Hungría fue α -bisabolol (24%); por el contrario, en los de los otros países este componente representaba sólo el 3%. Respecto al contenido en camazuleno, la cantidad máxima (14%) se halló en el de Gran Bretaña; las cifras de dicho compuesto fueron considerablemente menores (1-5%) en los restantes AE analizados. Las concentraciones de cisen-in-dicicloéter variaban del 13% al 22% y se encontraban más altas en el AE obtenido a partir de la muestra de Bélgica (22%). Los sesquiterpenos estaban representados, en su mayoría, por (E)- β -farneseno (2-7%); por otra parte, el compuesto monoterpénico principal de los aceites estudiados resultó la artemisia cetona. También se detectaron algunos compuestos alifáticos como el 3-octanol, el 1-decanol y el ácido decanoico. Finalmente, el contenido en ácido decanoico de los AE de Francia y Hungría fue del 3% y el 6% respectivamente.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio han establecido diferencias cuantitativas evidentes entre los compuestos biológicamente activos de AE procedentes de distintos países. Por consiguiente, es probable que esto se pueda traducir en variaciones en los efectos farmacológicos (fundamentalmente los antiinflamatorios), de estas plantas medicinales.

The higher yields (6.0-6.6 mg/g) of essential oil were obtained from chamomile of British origin, cultivated in the Experimental Garden of the University of Tartu, and also from Belgian and Estonian chamomile. A lower oil content (4.2-4.7) was found in Hungarian and French chamomile.

A comparison of chamomile oil composition from different samples showed a high variability of concentrations of the majority of biologically active constituents. In the oil of British origin, bisabolol oxide B amounted to 25%. In other samples studied, this value varied from 6% to 16%. The oils of French, Estonian and Belgian origin contained more bisabolol oxide A (43-55%) than the other samples (13-20%). The major component in Hungarian chamomile oil was alpha-bisabolol (24%), but in other oils the content of this component amounted to only 3%. A maximum content of chamazulene (14%) was found in the oil of British origin. In the oils from other countries, chamazulene content was much lower (1-5%). The concentration of cisenyne-dicycloether varied from 13 to 22% and was highest in the oil from Belgium (22%). Sesquiterpenes were mainly represented by (E)-beta-farnesene (2-7%) and the main monoterpene compound, in the chamomile oils studied, was artemisia ketone (1-2%). Some aliphatic compounds (3-octanol, 1-decanol, decanoic acid) were detected in the oils. The content of decanoic acid in the oils from France and Hungary amounted to 3% and to 6% respectively.

CONCLUSIONS

The results of this work have established noticeable quantitative differences in the quantity of biologically active compounds in chamomile oil from different origins. Consequently the pharmacological effects of these medicinal plants, being of a basically anti-inflammatory nature, are also likely to differ.

The oils from France, Belgium and Estonia belong to the bisabolol oxide A chemotype, while the oil from British origin belongs to the bisabolol oxide B and chamazulene-rich chemotype. Finally, the oil from Hungary was found to be of an alpha-bisabolol rich chemotype.

Los AE de Francia, Bélgica y Estonia pertenecen al quimiotipo del óxido de α -bisabolol, mientras que el AE de Gran Bretaña pertenece al quimiotipo del óxido de β -bisabolol, rico en camazuleno, y el de Hungría al quimiotipo rico en α -bisabolol.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Arak EA. Results of essential oil analysis of pineapple weed and wild chamomile by gas chromatographic method. Congress of Estonian Pharmacists. Theses, Tallinn, 1981; II: 79.
2. Arak EA, Pehk TT, Mäeorg UJ, Vahar VE, Altsaar TM. Isolation of spathulenol from essential oil of wild chamomile and its identification. Congress of Estonian Pharmacists. Theses, Tallinn, 1981; II: 84–87.
3. Pekic B, Zekovic Z, Marjanovic N, Petrovic L. Chamomile flowers (*Chamomillae flos*) extraction by supercritical carbon dioxide. Congress of Pharmacists of Yugoslavia, Theses, Beograd, 1994; I: 354–355.
4. Pekic B, Zekovic Z, Petrovic L, Adamovic D. Chemical investigation of tubular and ligulate chamomile flowers (*Matricaria chamomilla* L.). I. Congress of Pharmacists of Yugoslavia, Theses, Beograd, 1994; I: 352–353.
5. Brunke E-J, Hammerschmidt E-J, Schmaus G. Headspace analysis of selected European medicinal plants. Proceedings of the 12th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils, Eds. H.Woidlich and G.Buchbauer, Fachzeitschriftenverlag, Vienna, 1992: 105–124.
6. Marjanovic N, Pekic B, Petrovic L, Lepojevic Z, Zekovic Z. Determination of different components of chamomile essential oil (*Aetheroleum chamomillae*) using GC + MS. Zbornik Radova, 1992; 23: 189–195.
7. Vuorela H, Holm Y, Hiltunen R, Tarvela T, Laitinen A. Extraction of the volatile oil in chamomile flowerheads using supercritical carbon dioxide. Flavour Fragr J, 1990; 5: 81–84.
8. Reverchon E, Senatore F. Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry J Agric Food Chem, 1994; 42: 154–158.
9. Orav A, Kailas T, Ivask K. Volatile constituents of *Matricaria recutita* L. from Estonia. Proc Estonian Acad Sci Chem, 2001; 50; 1: 39–41.
10. Mahady GB, Fong HHS, Farnsworth NR. Botanical dietary supplements: quality, safety and efficacy. Swets&Zeitlinger Publishers, Lisse, 2001: 115–123.
11. Bisset NG. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1994: 323–325.
12. Evans WC. Trease and Evans' Pharmacognocny. 14th Edition. WB Saunders Company Ltd, 1998: 287–288.
13. European Pharmacopoeia. 4th Edition 4.02. Council of Europe. Strasbourg, 2002: 1519.
14. Davies NW. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. J Chromatogr, 1990; 503: 1–25.
15. Zenkevich, I.G. Analytical parameters of components of essential oils for their GC and GC-MS identification. Mono- and sesquiterpenes. Rastit. Resur., 1996; 32, 48 – 58.
16. Zenkevich, I.G. Analytical parameters of essential oils for their GC and GC-MS identification. Oxygencontaining derivatives of monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons. Rastit. Resur., 1997; 33, 16 – 28.
17. Zenkevich, I.G. Analytical parameters of components of essential oils for their GC and GC-MS identification. Acetates of terpenic alcohols. Rastit. Resur., 1999; 35, 30 –37