

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

АНАЛИЗ СУХОГО ЭКСТРАКТА КОРНЕВИЩ ПЕРЦА ОПЬЯНЯЮЩЕГО МЕТОДАМИ ХРОМАТОГРАФИИ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА И ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИИ

TLC AND GC-MS DETERMINATION OF KAVALACTONES FROM DRIED EXTRACT OF RHIZOMA KAVA-KAVA (PIPER METHYSTICUM)

**А.В. Чукарин^{1,2*}, Е.А. Симонов^{1,2}, А.В. Киричек¹, В.Е. Саломатин^{1,2}
A.V. Chukarin^{1,2}, E.A. Simonov^{1,2}, A.V. Kirichek¹, V.E. Salomatina^{1,2}**

¹ ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии,

² 111 Центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз Министерства обороны Российской Федерации

¹ I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Department of Toxicological Chemistry

² 111st Centre of Medico-Legal and Criminalistic Examination of Russian Ministry of Defense

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: перец опьяняющий, кавалактоны, кавайн, ТСХ, ГХ-МС

KEY WORDS: Piper methysticum, kavalactones, kavain, TLC, GC-MS.

РЕЗЮМЕ: Проведено исследование сухого экстракта корневищ Перца опьяняющего и БАД на его основе. Для качественного обнаружения кавалактонов предложена методика ТСХ, для качественной и количественной оценки этих веществ – методика ГХ-МС.

ABSTRACT: Kavalactones were investigated in dried extract of rhizoma kava-kava (Piper methysticum) and in biologically active additives (BAAs). A procedure of TLC with ultraviolet spectrophotometric detection has been developed for qualitative evaluation of these substances, and a GC-MS procedure – for quantitative and qualitative evaluation.

В соответствии с существовавшей в нашей стране системой регистрации биологически активных добавок (БАД), на сегодняшний день оказались разрешенными к применению на территории РФ БАД, содержащие сильнодействующие вещества, в том числе и несколько десятков, в составе которых есть перец опьяняющий (Piper methysticum).

Добавки, содержащие вещества из растения Piper methysticum относятся к списку № 1 сильнодействующих веществ с 1 января 2004 года (ПККН МЗ РФ:

Протокол от 22.10.03 №2/88-2003). В настоящее время БАД, содержащие Piper methysticum (кава-кава) признаны опасными для здоровья, 14 из них запрещены к применению на территории РФ (Постановление Главного санитарного врача МЗ РФ от 06.10.04 № 4), но до сих пор безрецептурные фитопрепараты и БАД с кавая-кава находятся на реализации в аптечной сети.

Основными действующими компонентами растения кавая-кава являются кавалактоны, которые относятся к токсичным веществам; их прием может вызвать привыкание, а злоупотребление ими может привести к наркотической зависимости.

На момент начала исследования за рубежом был выполнен ряд работ, посвященных изучению этого растения, однако необходимо было разработать и адаптировать к условиям отечественных судебно-медицинских бюро и криминалистических лабораторий методики качественного обнаружения (ТСХ и ГХ-МС) кавалактонов в сухом экстракте корневищ P. methysticum, входящем в состав БАД, оптимальных для идентификации этих веществ, в том числе и для задач криминалистики.

Для достижения поставленной цели на основе анализа литературы и собственных экспериментальных исследований выбраны условия пробоподготовки с учетом доступных в нашей стране реактивов и материалов, предложена методика обнаружения кавалактонов методом ТСХ, оценены возможности использования газовой хроматографии с капиллярной

* Адрес для переписки:

Чукарин А.В.

ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии, 121019 Россия, г. Москва, Никитский бульвар, д.13.

колонкой для обнаружения и количественного определения кавалактонов в сухом экстракте корневищ перца опьяняющего.

Род *Piper*, входящий в семейство *Piperaceae*, насчитывает более 700 видов. Среди растений, входящих в него, есть травы, кустарники, и даже встречаются деревья. Растения этого рода имеют важное социальное, экономическое и медицинское значение (Parmar et al., 1997). В последнее время субстанция (сухой экстракт корневищ *P. methysticum*) стала широко использоваться во всем мире для производства БАД и лекарственных средств природного происхождения.

Piper methysticum G. Forster (перец опьяняющий). Семейство *Piperaceae* (перечные). Синонимы: *Macropiper latifolium* Miq., *M. methysticum* (G. Forst.) Hook. et Arnott, *Piper inebrians* Soland (Parmar et al., 1997; Blaschek et al., 1998; WHO, 1999). Другие названия: Ядовитый перец, ava, awa, gea, gi, intoxicating pepper, kao, kava, kavakava, kava-kava, kavapipar, kawa, kawa kawa, kawa pepper, Kawapfeffer, kew, long pepper, malohu, maluk, maori kava, meruk, milik, racine de poivre enivrant, Rauschpfeffer, sakau, Tonga, Wurzelstock, yagona, yangona, yaqona (Singh, Blumenthal, 1997; Blaschek et al., 1998; Farnsworth, 1998; WHO, 1999).

Это растение встречается повсеместно в южной части тихоокеанского региона от Гавайских островов до Новой Гвинеи и возделывается полинезийцами (WHO, 1999; PDR for Herbal Medicines, 2003).

Краткое ботаническое описание. Многолетний лиственный сочный кустарник высотой до 7 м (Singh, 1992), обычно 2-3 м. Листья тонкие, очередные, черешковые, сердцевидные, гладкие и зеленые с обеих сторон (Farnsworth, 1998; WHO, 1999; PDR for Herbal Medicines, 2003). Корневище очень сочное, узловатое, толстое, иногда клубневидное, длиной до 60 см и до 8 см в диаметре, с боковыми корнями длиной до 3 м. Свежее корневище черновато-серое снаружи и беловатое изнутри (Farnsworth, 1998). Высушенное корневище: неправильные, поперечные и продольные куски, значительно различающиеся по размеру и форме (длиной 3-20 см, 1-5 см в диаметре). Наружняя поверхность светло-желтоватая или серовато-коричневая, продольно сморщенная, с большими беловатыми круглыми рубцами (WHO, 1999). Запах: слабый, приятный, напоминающий запах сирени; вкус: сладковатый, жгучий, иногда немного горький, вызывает чувство слабого онемения (WHO, 1999; PDR for Herbal Medicines, 2003).

Высушенное корневище перца опьяняющего содержит 43,0% крахмала, 20,0% волокон, 12,0% воды, 3,2% сахаров, 3,6% протеинов, 3-20% кавалактонов (в зависимости от возраста растения и характера его окультуренности) (Shulgin, 1973).

Кавалактоны, содержащиеся в смоле, представляют собой α -пироны, имеющие одну метоксигруппу с четырьмя атомами углерода и одну ароматическую стироловую половину с 6 атомами углерода. В среднем в корневище кавы содержится: кавина (1,8%), метистицина (1,2%), дигидрометистицина (0,5%),

деметоксиянгонина (1,0%), янгонина (1,0%), дигидрокаваина (1,0%) (Whitton et al., 2003).

В химический состав производящего растения входят различные минеральные вещества, в том числе калий, кальций, магний, натрий, алюминий, железо и диоксид кремния; сахара, к которым относятся сахароза, мальтоза, фруктоза и глюкоза; более 15 аминокислот и другие соединения. В высушенном порошке корневищ кавы-кавы содержится: N – 0,37; P – 0,27; K – 0,63; Mg – 0,07 и Ca – 0,46 % (Lebot, 1989; Xuan et al., 2003).

Считается, что кавалактоны поддерживают интеллектуальный тонус при одновременном мышечном релаксирующем действии (Backhaus, Krieglstein, 1992; Pittler, 2000). Они функционируют через лимбическую систему, моделируя эмоциональные процессы. Их успокаивающее действие по механизму отличается от диазепинов (Backhaus, Krieglstein, 1992; BfArM, 2002; PDR for Herbal Medicines, 2003). Наряду с миорелаксирующим и успокаивающим действием, кавы-кава оказывает противосудорожный, снотворный и обезболивающий эффект (Gleitz et al., 1996; Kenyatta, 2001). Установлено, что обезболивающий эффект кавы-кавы не ограничивается воздействием на опиатные рецепторы и отличается от действия морфина и других анальгетиков (Jamieson et al., 1989; Jamieson, Duffield, 1990; Davies et al., 1992). При приеме на ночь вызывает глубокий сон, однако может применяться и как дневное тонизирующее средство, применяется при некоторых инфекционных заболеваниях, неврозах, тревожных расстройствах (состояниях тревоги, напряжения, страха, беспокойства). Кава оказалась эффективной при сосудистых нарушениях головного мозга, выявлена ее способность ограничивать инфарктную зону при инфаркте миокарда. Она может применяться при лечении абстинентного синдрома, при привыкании к бензодиазепинам и опиатам (Backhaus, Krieglstein, 1992; Jussofie et al., 1994; Pittler, Edzard, 2000; Chikara, 2003).

По подтвержденным клиническими исследованиями данным, препараты из кавы-кавы назначают при краткосрочном лечении легких форм беспокойства и бессонницы, применяют при нервозности, стрессе и повышенной возбудимости (WHO, 1999; Pittler, Edzard, 2000). Кава обладает антимикробной активностью, спиртовой экстракт корневища препятствовал росту *in vitro* некоторых видов микробов (Abourashed, Khan, 2000; WHO, 1999; Xuan, 2003).

В народной медицине растение используется при лечении астмы, простуды, ревматизма, хронического цистита, гонореи, сифилиса, головных болей, бессонницы, диспепсических расстройств, менструальных нарушений цикла, мочеполовых инфекций и даже бородавок. Является средством для снижения веса (Lembert, 1967; Pittler, Edzard, 2000).

Используется в гомеопатии при состояниях эмоционального возбуждения и усталости, при гастритах и болях в урете (PDR for Herbal Medicines, 2003).

Экспериментальная часть

Оборудование и материалы. Для проведения тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластинки HPTLC Kieselgel 60F254 фирма «Merck KGaA», (Германия) размером 10×10 см, а также пластинки «Sorbfil» ЗАО «Сорбполимер» ПТСХ-АФ-А-УФ размером 10×10 см. Фронт прохождения растворителя около 8 см.

Нанесение исследуемых извлечений на пластинки осуществляли при помощи микрошприца на 0,01 мл (фирма «Agilent Technologies», США). Для удобства проведения хроматографии в тонком слое использовали столик для нанесения образцов на пластины (с подогревом) УСП 1М № 007-04.

В качестве подвижной фазы использовали следующие растворители: этилацетат, гексан, хлороформ, метанол, этанол, ацетон. Хроматограммы просматривали в видимом и УФ-свете (254 и 365 нм) с помощью облучателя хроматографического УФС-254/365 ЗАО «Сорбполимер», г. Краснодар (ТУ 4215-004-16943778-99) до и после обработки реактивом Эрлиха модифицированным.

Для проведения взвешивания образцов использовали весы аналитические ТВ-215D фирма «Denver Instrument», (США).

Для проведения очистки использовали картридж для твердофазной экстракции AccuBond II EVIDEX 200 mg, 3 ml, фирма «Agilent Technologies», (США).

Исследования методом газовой хроматографии проводили на газовом хроматографе с масс-селективным детектором 6890-5973N, фирма «Agilent Technologies» (США).

Приготовление рабочих растворов. Приготовление реактива Эрлиха модифицированного: 1 г парадиметиламинобензальдегида растворяли в 10 мл метанола в мерной колбе вместимостью 50 мл и 10 мл концентрированной орто-фосфорной кислоты (плотность 1,75 г/мл).

Методы исследования.

Пробоподготовка образцов БАД (сухого экстракта). В картридж для твердофазной экстракции вместимостью 3 мл помещали навеску сухого экстракта корневища *Piper methysticum* массой 0,3 г, взвешенную на аналитических весах ТВ-215D, заливали 3 мл 95% спирта. Полученное извлечение подвергали исследованию методами ТСХ и газовой хроматографии.

Хроматография в тонком слое сорбента.

Подбор экстрагента. Точную навеску 0,3 г сухого экстракта экстрагировали 3 раза по 1 мл ацетона или, аналогично, этанола. Контроль полноты извлечения и степень очистки проводили хроматографическим, а после спектрофотометрическим методом. От каждого извлечения отбирали 10 мкл пробы и наносили на пластинку для ТСХ, затем после проведения очистки меняли растворитель и делали однократное извлечение, которое наносили по 10 мкл в точку на ту же пластинку ТСХ. Проводили хроматографию в

тонком слое. Ацетон экстрагировал кавалактоны не полностью (в спиртовом извлечении, полученном после 3-кратной ацетоновой очистки, обнаружены кавалактоны), при использовании этилового спирта было достигнуто полное извлечение.

Подбор системы растворителей для ТСХ. Первой была опробована система растворителей: этилацетат – гексан (7:3), которая показала неплохой результат. Хроматографическую камеру предварительно насыщали в течение 30 минут. В этой системе происходило разделение с получением нескольких зон абсорбции на пластинке (табл. 1). Время прохождения фронта растворителей 25 минут. Однако полученные результаты были подвергнуты критике, так как зоны поглощения при просматривании пластинки в УФ-спектре были заметно неоднородны. Было решено проверить несколько других систем растворителей и пригодность данной системы растворителей в других соотношениях (табл. 1).

Исходя из полученных данных было решено проверить еще одно соотношение системы растворителей: этилацетат – гексан (2:3).

В соотношении этилацетат – гексан (2:3) разделение веществ прошло лучше, на хроматограмме четко видны 8 зон поглощения в УФ-спектре. Rf полученных зон поглощения 0,18; 0,29; 0,37; 0,59; 0,65; 0,74; 0,78; 0,86.

Подбор условий детектирования хроматограммы. При просмотре хроматограмм до обработки хромогенными реактивами в видимом свете идентифицируется несколько зон абсорбции желтого цвета с различными Rf, которые могут относиться к той или иной группе веществ. В УФ-свете также идентифицируются 8 зон абсорбции.

Детектирование хроматограммы проводили модифицированным реактивом Эрлиха. Изменения окраски зон поглощения заносили в журнал, в течение времени окраска изменялась.

После проявления хроматограммы реактивом Эрлиха модифицированным, зоны поглощения изменяли свой цвет не только в видимом спектре, но и в УФ-диапазоне. При последующем просмотре хроматограмм в УФ-свете идентифицируются несколько зон абсорбции.

Методика проведения ТСХ. На линию старта пластинки Kieselgel при помощи микрошприца наносили 0,01 мл извлечения из сухого экстракта корневищ кавы в точку на расстоянии 2 см от края, на расстоянии 3 см делали «полосу» длиной 1 см. Пластинку помещали в камеру для ТСХ с системой растворителей этилацетат: гексан = 2:3 и хроматографировали восходящим способом. Время насыщения камеры не менее 30 минут. После прохождения фронта растворителей около 8 см пластинку вынимали из камеры, просушивали на воздухе под тягой в течение 15 минут. Просматривали в УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм. На хроматограммах присутствуют по 8 зон абсорбции.

Обрабатывали реактивом Эрлиха модифицированным. После просушивания пластинку просматривали в УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм.

Таблица 1. Выбор системы растворителей для оптимального разделения кавалактонов.

Система растворителей	Видимое освещение, Rf	УФ (254 нм), Rf	УФ (365 нм), Rf
Гексан	Оптимального разделения не достигнуто. Все вещества остались на старте.		
Этилацетат	0,59	0,57	0,65
	0,70	0,67	0,70
	0,77	0,81	0,81
	0,86	0,86	0,86
Этилацетат: гексан = 1:1	0,54	0,38	0,54
	0,62	0,54	0,62
	0,69	0,58	0,69
	0,77	0,62	0,82
	0,86	0,69	0,88
			0,82
Этилацетат: гексан = 7:3	0,62	0,35	0,35
	0,70	0,45	0,45
	0,81	0,60	0,60
	0,87	0,70	0,69
		0,81	0,81
Этилацетат: гексан = 1:2		0,89	0,85
	0,26	0,16	0,18
	0,32	0,25	0,22
	0,44	0,32	0,30
	0,58	0,44	0,43
	0,68	0,58	0,58
Хлороформ	0,85	0,68	0,67
		0,85	0,74
	0,27	0,27	0,27
	0,67	0,67	0,51
		0,98	0,56
Метанол	Оптимального разделения не достигнуто. Все вещества остались на старте.		
Метанол: уксусная кислота = 100:1,5	Оптимального разделения не достигнуто. Все вещества остались на старте.		

Газохроматографический анализ. На пластинки ТСХ, наносили в точку 10 мкл в двух сантиметрах от края и по 10 мкл в точку на полосу с 3 см по 8 см на линии старта. Получали хроматограммы в подобранной системе растворителей (этилацетат: гексан = 2:3). Всего для исследования выбрано 6 фракций. Каждую фракцию аккуратно снимали с пластинок и переносили в патроны для твердофазной экстракции. Заливали 1 мл 95% этанола.

После проведения хроматографирования масс-спектры, соответствующие вершинам хроматографических пиков, сравнивали по стандартной методике с масс-спектрами библиотек «PMWTOX3», «NIST02» и «Wiley7N».

Масс-спектры считали идентифицированными при совпадении масс-спектров исследуемого ве-

щества с библиотечным с коэффициентом подобия, рассчитанным по стандартной методике, превышающим 90%.

Режим ионизации электронным ударом 70 эВ, капиллярная колонка HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0,25 мм. Газ-носитель – гелий. Температура инжектора и интерфейса 250 и 280°C соответственно. Температура колонки программировалась от 100°C до 310°C с повышением температуры 25°C/мин. Ввод образца размером 1 мкл осуществляли методом с делением потока газа-носителя (1:30). Масс-спектрометр работал в режиме снятия масс-спектров в диапазоне от 31 до 550 m/z.

Содержание компонентов в каждой фракции определяли методом внутренней нормализации по площадям хроматографических пиков (табл. 2).

Таблица 2. Содержание обнаруженных в сухом экстракте веществ по фракциям¹

№ фракции	Время удерживания, мин	Название	Содержание, %
0	6,19	Транс-борнил циннамат	4,84
	6,55	Цис-борнил циннамат	16,70
	7,02	Пиностробин халкон	4,41
1	7,02	Пиностробин халкон	9,28
	7,41	5,7-диметоксифлаванон	13,76
	7,62	Не идентифицированное вещество	32,21
	7,77	5-гидрокси-4',7-диметоксифлаванон	8,52
2	8,24	Не идентифицированное вещество	16,9
	8,65	Не идентифицированное вещество	31,4
	10,04	Кампестерол	0,93
	10,24	Стигмастерол	1,61
	10,67	Ситостерол	6,71
3	6,31	Кавайн*	10,48
	6,42	Не идентифицированное вещество	22,42
	6,91	5,6-дегидрокаваин*	28,52
4	6,72	Кавайн*	14,58
	7,12	Янгонин*	10,22
	7,46	7,8-дигидрометистицин*	15,47
	7,76	Янгонин*	14,51
5	6,17	7-метокси-7-(п-метоксифенил)-2-норборнен	18,88
	7,42	7,8-дигидрометистицин*	12,30
	7,51	Смесь: тетрагидро-11-метоксиянгонин* с не идентифицированным веществом	4,23
	7,80	Метистицин*	28,18

Примечания:

¹ - В каждой фракции, кроме указанных в таблице веществ были обнаружены жирные кислоты, углеводороды, в основном нормальные, фталаты, а также большое количество не идентифицированных веществ, относящихся к флавоноидам, сексвитерпенам и аналогичным им веществам.

* - Отмечены кавалактоны.

Выводы

1. Предложена методика качественного обнаружения кавалактонов методом хроматографии в тонком слое сорбента.

2. Изучен химический состав сухого экстракта корневищ *Piper methysticum* методами газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Установлено наличие флавоноидов, халконов, сексвитерпенов и кавалактонов. Количественно определено их содержание способом внутренней нормализации (по площадям хроматографических пиков).

3. Предложенные методики позволяют достоверно идентифицировать кавалактоны в сухом экстракте корневищ кавы и БАД на его основе и могут быть использованы при создании нормативной документации на субстанцию и лекарственные средства на основе *Piper methysticum*.

Литература

- Abourashed E.A., Khan I.A. 1996-1998, 2000. Microbial Transformation of Kawain and Methysticin // Chem. Pharm. Bull. 48, 12. Vol.48. No.12.
- Backhaus C., Krieglstein J. 1992. Extract of kava (*Piper methysticum*) and its methysticin constituents protect brain tissue against ischemic damage in rodents // Eur. J. Pharmac. 215. 265–269.
- BfArM (Bundesanstalt für Arzneimittel und Medizinprodukte). Abwehr von Arzneimittelrisiken, Stufe II: Kava-kava (*Piper methysticum*) -haltige und Kavain-haltige Arzneimittel einschliesslich homeopathischer Zubereitungen mit einer Endkonzentration bis einschliesslich D4. Bescheid vom 14.06.2002 an Pharmazeutische Unternehmer. Bonn, Germany, 2002.
- Blaschek W. et al. 1998. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis // Folgeband 2: Drogen A–K, 5th ed. Berlin, Springer-Verlag.
- Chikara J. 2003. Study on the allelopathy of Kava (*Piper*

- methysticum L.) // MSc Thesis. Miyazaki University. Japan, P.70.
- Davies L.P., Drew C.A., Duffield P. et al. 1992. Kava pyrones and resin: studies on GABAA, GABAB and benzodiazepine binding sites in rodent brain. *Pharmacol Toxicol.* Aug, 71, 2. P.120-126.
- Famsworth N.R. et al. 1998. NAPRALERT database // Chicago, University of Illinois at Chicago, IL, production (an online database available directly through the Scientific and Technical Network [STN] of Chemical Abstracts Services).
- Gleitz J., Friese J., Beile A. et al. 1996. Anticonvulsive action of (+/-)-kavain estimated from its properties on stimulated synaptosomes and Na⁺ channel receptor sites // *Eur J Pharmacol.* 315, 1. P.89-97.
- Jamieson D.D., Duffield P.H. 1990. Positive interaction of ethanol and kava resin in mice // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 17, 7. P.509-514.
- Jamieson D.D., Duffield P.H., Cheng D. et al. 1989. Comparison of the central nervous system activity of the aqueous and lipid extract of kava (*Piper methysticum*) // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 301. P.66-80.
- Jussofie A. et al. 1994. Kavapyrone enriched extract from *Piper methysticum* as modulator of the GABA binding site in different regions of rat brain // *Psychopharmacology (Berl)*. 116, 4. P.469-474.
- Kenyatta K.S. 2001. Anxiolytic effects of kava extract and kavalactones in the chick social separation-stress paradigm // *Psychopharmacology.* 155. P.86-90.
- Lebot V., Ler vesque J. 1989. The origin and distribution of kava (*Piper methysticum* Forst. F., Piperaceae): a phytochemical approach // *Allertonia.* 5. P.223-281.
- Lembert E.M. 1967. Secular use of kava in Tonga // *Q. J. Stud. Alcohol.* 28. P.328-341.
- Parmar V.S. et al. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper* // *Phytochemistry.* Vol.46. No.4. P.597-673.
- Pittler M.H., Edzard E. 2000. Efficacy of kava extract for treating anxiety: systematic review and meta-analysis // *J. Clin. Psychopharmacol.* 20. P.84-89.
- PDR for Herbal Medicines. Herbal monographs. 2003. P.443-446.
- Shulgin A.T. 1973. The narcotic pepper – the chemistry and pharmacology of *Piper methysticum* and related species // *Bull Narcotics.* 25. P.58-72.
- Singh Y.N. 1992. Kava: an overview // *Journal of Ethnopharmacology.* 37. P.13-45.
- Singh Y.N., Blumenthal M. 1997. Kava: an overview. Distribution, mythology, culture, chemistry and pharmacology of the South Pacific's most revered herb // *Herbalgram.* 39. P.33-56. (Special Review).
- Whitton P.A. et al. 2003. Kava lactones and the kava-kava controversy // *Phytochemistry.* 64. P.673-679.
- World Health Organization (WHO). 1999. Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol. I. P.231-245. Geneva.
- Xuan T.D. et al. 2003. Kava root (*Piper methysticum* L.) as a potential natural herbicide and fungicide // *Crop Protection.* 22. P.873-881.