

*Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie und Institut für Angewandte Zoologie und
Phytopathologie der Universität Gießen*

Isolierung einer Substanz aus *Taxus baccata* L. und *Taxus baccata* cv. *fastigiata* Loud. mit insektizider und metamorphosestörender Wirkung auf *Epilachna varivestis* Muls. (Col., Coccinellidae)¹

Von C. SCHANNÉ

Abstract

*Isolation of a constituent from *Taxus baccata* L. and *Taxus baccata* cv. *fastigiata* Loud. with insecticidal and metamorphosis disrupting effects on *Epilachna varivestis* Muls. (Col., Coccinellidae)*

Extracts from *Taxus baccata* L. ground leaves and *Taxus baccata* cv. *fastigiata* Loud. cause insecticidal effects on third and fourth instar larvae of *Epilachna varivestis* Muls. The molt events of fourth instar larvae to pupae and of pupae to adults are disrupted. These effects occur only after oral application. The biologically active constituent is isolated by solvent fractionation of the acidified concentrate from methanolic extracts, by two successive liquid column chromatography steps and by preparative TLC. The component is detected after TLC (R_f value 0.35, chloroform-methanol, 88–12) by fluorescence quenching or by staining with vanillin sulfuric acid. Spectral investigations reveal max (methanol) at 228 nm and 264 nm. The retention time on a RP-18, 5 μ m LiChroSpher, 4 \times 250 mm column (HPLC) is 3.20 min (acetonitril-water, 45–55). The chemical identity of the component as taxane derivative and its possible mode of action as primarily cytotoxic are discussed.

1 Einleitung

Die seit dem Altertum bekannte Giftigkeit der Eiben für den Menschen und einige seiner Nutztiere führte zu intensiven Studien über ihre Inhaltsstoffe (HEGNAUER 1962; KHAN et al. 1976; MORELLI 1976; MILLER 1980; HEGNAUER 1986). Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag auf medizinisch-toxikologischem Gebiet.

Die Beobachtung, daß Eiben nicht von Blattläusen und kaum von anderen Schadinsekten befallen werden, veranlaßte SCHMIDT (1953), mögliche fraßabschreckende und insektizide Wirkungen auf verschiedene Insekten zu untersuchen. Er konnte jedoch weder mit wässrigen und alkoholischen Rohextrakten noch mit der Alkaloidmischung Taxin in Kontakt- und Fraßtests die erwarteten Wirkungen erzielen. Ebenso wenig gelang es WRIGHT und SPATES (1972), mit Petrolether-Extrakten eine juvenoide Wirkung im *Stomoxys*-Biotest nachzuweisen. Erst SCHUSTER (1982) stellte mit Eibenextrakten Häutungsstörungen bei *Epilachna varivestis* fest und vermutete, daß dafür die in Eiben nachgewiesenen Ecdysteroide (HOFFMEISTER et al. 1967; TAKEMOTO et al. 1967) verantwortlich seien. In weiteren Untersuchungen (SCHANNÉ 1987) konnte gezeigt werden, daß Extrakte aus *Taxus baccata* L. und *Taxus baccata* cv. *fastigiata* Loud. die Viertlarvenentwicklung und Metamorphose von *E. varivestis* in charakteristischer Weise beeinflussen. Die vorliegende Veröffentlichung beschreibt die Isolierung des Wirkstoffes sowie die Schadeffekte bei Dritt- und Viertlarven.

¹ Die in dieser Veröffentlichung dargestellten Ergebnisse sind Teil einer Dissertation.

2 Material and Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Junge Triebe von *T. baccata* cv. *fastigiata* (♀) sowie junge Triebe in Bodennähe wachsender, nicht fruktifizierender Äste von *T. baccata* (♀) wurden während der Sommermonate Juli und August 1986 geerntet, im Trockenschrank bei 40 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in einer Kaffeemühle zu einem feinen Pulver gemahlen. Bis zur Extraktion wurde dieses dann in Vorratsbehältern im Dunkeln bei Zimmertemperatur gelagert.

2.2 Insektenmaterial

Die Larven von *Epilachna varivestis* Muls. stammten aus der Zucht des Instituts für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Universität Gießen. Sie können problemlos unter den von STEETS (1976) beschriebenen Bedingungen gehalten werden. Als Testtiere dienten synchronisierte Drittlarven (L₃) und Viertlarven (L₄).

2.3 Extraktion und Isolierung

Rohextrakte wurden unter Stickstoffatmosphäre bei 55 °C auf einem Magnetrührer oder in einem Soxhlet-Extraktor hergestellt (FEUERHAKE und SCHMUTTERER 1982) und durch Lagerung bei -18 °C entfettet.

Für die Säulenchromatographie fanden Glassäulen (20 × 1,50 cm) Verwendung. Chromatographiert wurden jeweils 50 mg Substanz an 14 g Kieselgel 60 (70-230 mesh) mit 150 ml Laufmittel bei einer Flußrate von 3 ml/min.

Die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) erfolgte an Polygram Sil G/UV₂₅₄ Platten (5 × 10 cm, 0,25 mm Schichtdicke) und Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten für die nano-DC (5 × 10 cm, 0,25 mm Schichtdicke). Für die semipräparative DC (PSC) wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten (5 × 10 cm, 0,25 mm und 0,5 mm Schichtdicke) verwendet. Die Auswertung erfolgte im UV₂₅₄ oder nach Anfärbung mit Vanillin-Schwefelsäure. Banden bzw. Bandenbereiche wurden mit Ether (tertiärer Methylbutylether) eluiert.

UV-Spektren wurden mit einem Beckman DU-50 UV-Spektrophotometer aufgenommen.

Zur analytischen HPLC (Merck/Hitachi, 655A-11 Liquid Chromatograph, 655A Variable Wavelength UV-Detektor, D-2000 Chromato-Integrator) wurde eine RP-18-Säule (5 µm LiChroSpher 250 × 4 mm mit Vorsäule 4 × 4 mm) benutzt und als mobile Phase Acetonitril-Wasser (45:55) bei einer Flußrate von 1 ml/min eingesetzt².

Zur Extraktion und Ausschüttelung des Wirkstoffes dienten Lösungsmittel mit pA-Qualität. Die Chromatographie erfolgte in Lösungsmitteln für die Chromatographie. Konzentrationen in Prozent oder ppm geben das Verhältnis des Gewichts gelöster Substanz und Lösungsmittelvolumen (w/v) an.

2.4 Biotest

In dem leicht modifizierten Fraßtest von STEETS (1976) wurden je zwei L₄-Larven oder zehn L₃-Larven eine Blattfläche von 49 cm² angeboten, auf die 400 µl der Testlösungen (in 50 % MeOH) aufgespritzt worden waren. Nach einem Tag erfolgte das Umsetzen auf unbehandelte Pflanzen. Jede Konzentrationsstufe wurde mit 10 Tieren getestet. Alle Testlösungen, die bei Konzentrationen über 1000 ppm (0,1 %) keine Wirkung zeigten, galten als unwirksam. L₄-Larven wurden 2 µl Lösung (in 1 % unvergälltem Ethanol in Insektenringer) mit einer Hamiltonspritze injiziert.

3 Ergebnisse

3.1 Substanzisolierung

3.1.1 Vorreinigung

Zur Reinigung der Rohextrakte wurde ein Verfahren zur Fraktionierung entwickelt (Abb. 1), das grobe Stofftrennungen sowohl nach dem Prinzip der Verteilung zwischen wäßriger Phase und nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln als auch nach dem Prinzip der Salzbildung bzw. Zerlegung von Salzen ermöglichte. Ihm zugrunde liegen ein Extraktions-

² Trennungen durch HPLC wurden zusammen mit Dr. ERMEL am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Universität Gießen durchgeführt.

modell nach HARBORNE (1984) und ein modifizierter Stas-Otto Analysengang (AUTERHOFF und KOVAR 1977). Die Wirkungsschwellen der Fraktionen II und IV + V lagen im Biotest mit 120 ppm auf vergleichbarem Niveau. Fraktion II enthielt jedoch mehr polare Verunreinigungen. Sie kann hauptsächlich zur schnellen Aktivitätsprüfung von Pflanzenmaterial hergestellt werden, während Fraktion IV + V durch Säulenchromatographie weiter gereinigt werden kann.

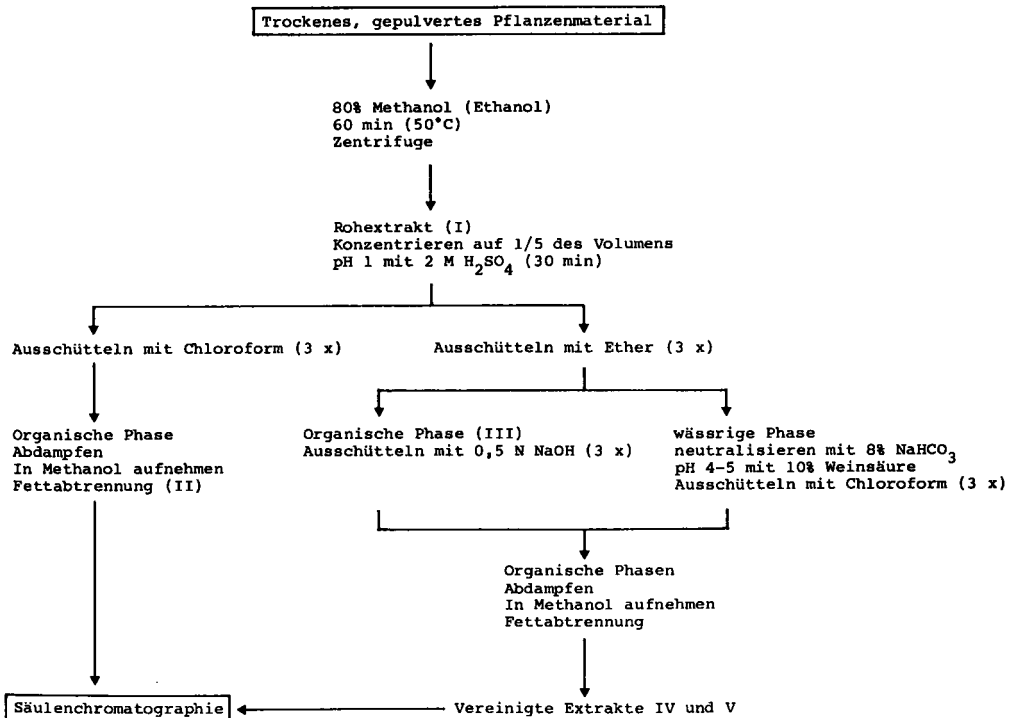


Abb. 1. Modell zur Reinigung eines methanolischen Rohextraktes aus *Taxus baccata* (cv. *fastigiata*) für die Säulenchromatographie (Modifiziert nach HARBORNE [1984] und AUTERHOFF und KOVAR [1977])

3.1.2 Säulenchromatographie

Nach Elution mit einem fünfstufigen Toluol-Ethylacetat Gradienten (Säule 1) waren die Fraktionen Toluol-Ethylacetat (4:6) und (2:8) biologisch wirksam. Die Wirkungsschwelle der vereinigten Fraktionen lag bei 50 ppm. Eine zweite Säulenchromatographie mit Chloroform-Methanol (9:1) erbrachte eine Fraktion, die bis auf geringe Verunreinigungen nur den Wirkstoff enthielt und deren Wirkungsschwelle bei 10 ppm lag. Biologisch aktiv erwies sich eine Fraktion von 50 ml, die gewonnen wurde, nachdem eine im sichtbaren Licht zitronengelbe Bande im Eluat erschien.

3.1.3 Dünnschichtchromatographie

Das Laufmittel Chloroform-Methanol (88:12) ergibt eine optimale Bandendifferenzierung der vorgereinigten Proben. Das Eluat der Bande mit dem R_f -Wert 0,35 war das einzige Bandeneluat mit biologischer Wirkung. Die Trennung in verschiedenen Laufmitteln zeigte die Homogenität der Bande: Ethylacetat-Methanol-Wasser (100:13,5:10) R_f -Wert 0,58; Ethylacetat-Toluol (8:2) R_f -Wert 0,19; Chloroform-Aceton (3:2) R_f -Wert 0,25.

3.1.4 UV-Spektrum und HPLC

Das durch PSC gewonnene Bandeneluat hatte in Methanol ein Absorptionsmaximum bei 228 nm und eine Schulter bei 264 nm. Die HPLC-Chromatogramme (Abb. 2) zeigten den Peak des Wirkstoffes in verschieden stark gereinigten Proben bei einer Retentionszeit von 3,20 min (Laufmittel: Acetonitril-Wasser [45:55]).

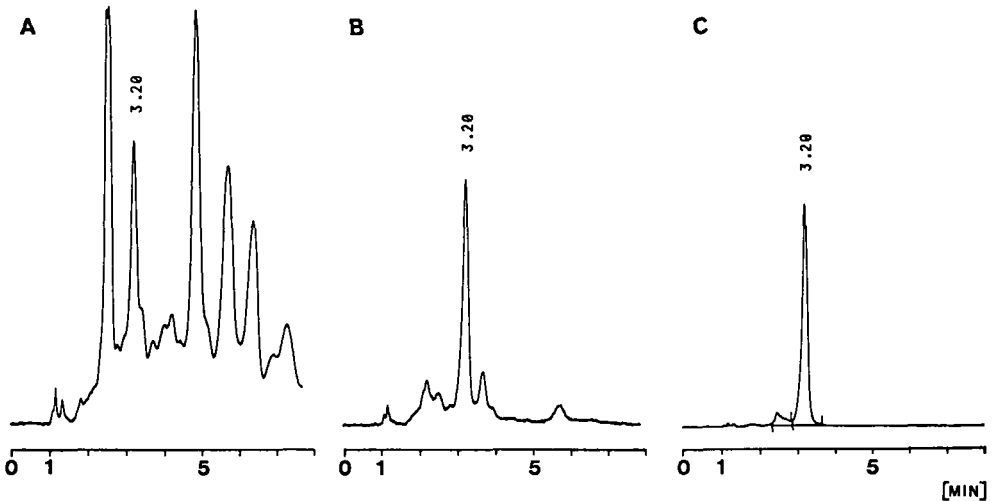


Abb. 2. HPLC-Chromatogramme mit dem Peak der biologisch aktiven Substanz (Retentionszeit: 3,20 min) in verschieden stark gereinigten Proben unterschiedlicher Konzentration. Laufmittel: Acetonitril-Wasser (45:55), Detektion: 228 nm, Papiervorschub: 1 cm/min, Schreiberabschwächung: 8 mV (A und B), 32 mV (C). A und B: Biologisch aktive Fraktionen der ersten und zweiten Säulenchromatographie, C: Bandeneluat des Wirkstoffes nach präparativer DC der biologisch wirksamen Fraktion der zweiten Säulenchromatographie

3.2 Biologische Wirkung

Eine biologische Wirkung war nur nach oraler Substanzapplikation zu erzielen. Versuche mit topikal Applikation sowie Injektion der Wirksubstanz verliefen negativ.

3.2.1 Schadenssymptome

Nach der Applikation waren bei L₄-Larven 3 grundsätzlich verschiedene Schadverläufe zu beobachten:

1. Larvenschädigung unter Ausprägung eines spezifischen Schadbildes. Die Versuchstiere nahmen nur eine geringe Menge behandelten Futters auf und stellten dann den Fraß endgültig ein. Kurz danach bewegten sie sich nur noch sehr langsam oder gar nicht mehr; ihre Extremitäten zitterten unkontrolliert. Bereits nach wenigen Stunden waren sie ventral eingekrümmt, in Thorax und Abdomen hatten sich der parietale und viscerale Fettkörper aufgelöst, wie Präparationen und histologische Untersuchungen zeigten. Der Mitteldarm enthielt braunen Inhalt und war durch das Integument sichtbar. In diesem Zustand verblieben die Larven und trockneten schließlich aus.

2. „Unspezifische“ Larvenschädigung. Die Versuchstiere fraßen das gesamte Blattmaterial, ohne Wirkungen zu zeigen. Nach dem Umsetzen auf unbehandelte Bohnenpflanzen wurde aber kaum noch oder kein Futter mehr aufgenommen. Die Tiere konnten die

Larvalentwicklung nicht beenden und starben als „Dauerlarven“. Entweder waren äußerlich keine Schadenssymptome erkennbar, oder der thorakale Fettkörper wurde aufgelöst.

3. Metamorphosestörungen. Fraßleistung und Dauer des L₄-Stadiums entsprachen denen unbehandelter Kontrollen. Aber die L₄-Larven verpuppten sich nicht oder nur unvollständig bzw. die Puppen konnten sich nicht oder nur unvollständig zu Imagines häuten. Schädigungen von Puppen waren nur selten zu beobachten.

Das Schadbild konnte durch die Konzentration des Wirkstoffs und das Alter der L₄-Larven zum Zeitpunkt der Applikation beeinflusst werden. Nach Applikation niedriger Konzentrationen³ reagierten 5, 24 und 48 h alte L₄-Larven mit Metamorphosestörungen. Bei hohen Konzentrationen wurden L₄-Larven, die im Alter von 5 und 24 h behandelt wurden, vor allem unspezifisch geschädigt. Dagegen zeigten im Alter von 48 h behandelte L₄-Larven fast ausschließlich das spezifische Schadbild.

Behandelte L₃-Larven zeigten Schadenssymptome, die den unter 1. dargestellten von L₄-Larven vergleichbar sind. L₃-Larven waren aber wesentlich empfindlicher. Metamorphosestörungen konnten nicht beobachtet werden.

3.2.2 Sensibilität

Die Sensibilität im Verlauf der Entwicklung von L₃- und L₄-Larven stimmte insofern überein, als beide Stadien zu Beginn am empfindlichsten waren und während der Entwicklung ein leichter Sensibilitätsverlust zu beobachten war. Am letzten Tag der Nahrungsaufnahme ging die Empfindlichkeit trotz unverminderter Fraßleistung gänzlich verloren.

4 Diskussion

4.1 Chemische Zuordnung des Wirkstoffes

Die angewendeten Methoden lassen nur eingeschränkte Aussagen über die Identität des isolierten Wirkstoffes zu. Nach dem Löslichkeitsverhalten ist der Wirkstoff ein Neutralstoff mit mäßig polaren Eigenschaften und der Stoffklasse der Terpene oder Phenole zuzuordnen (AUTERHOFF und KOVAR 1977; HARBORNE 1984).

Die früher aus *T. baccata* isolierten Triterpene 20-Hydroxyecdysone und Ponasteron A sind als Wirkstoffe auszuschließen: Im Dünnschichtchromatogramm war die 20-Hydroxyecdysonebande (Laufmittel Chloroform-Methanol [88:12], R_f-Wert 0,16) nicht mit der hier ermittelten Wirkstoffbande identisch. Die UV-Spektren von 20-Hydroxyecdysone und Ponasteron A (Absorptionsmaxima bei 242 bzw. 244 nm [Methanol], HOFFMANN und HETRU 1983) unterschieden sich vom UV-Spektrum des Wirkstoffes. Auch das für Wirbeltiere toxische Taxin B (vgl. SCHULTE 1975) als Hauptbestandteil der Alkaloidmischung Taxin kann ausgeschlossen werden. Wie erwähnt konnten mit Taxin keine Wirkungen auf Insekten erzielt werden (SCHMIDT 1953). Taxin kann, abgesehen vom Arillus des Samens aus allen Pflanzenteilen von *T. baccata* isoliert werden (ROTH et al. 1984), im *Epilachna*-Biotest sind jedoch nur Extrakte aus Trieben in Bodennähe wachsender, nicht fruktifizierender Äste wirksam. GRAF (1958) gibt für Taxin B ein Absorptionsmaximum von 276 nm (Methanol) an, FROHNE und PRIBILLA (1965) für das Gesamttaxin 272 nm (Chloroform). Des weiteren bevorzugt Taxin B bei der Verteilung zwischen organischem Lösungsmittel und Wasser die wässrige Phase (GRAF et al. 1963). Dies steht im Gegensatz zu den hier beschriebenen Fraktionierungsergebnissen.

Dennoch ist es möglich, daß der gefundene Wirkstoff der für die Familie der Taxaceae

³ Die Termini „niedrige“ bzw. „hohe“ Konzentration sind in diesem Beitrag relativ zu verstehen: Sie beziehen sich auf den Konzentrationsbereich zwischen Wirkungsschwelle und EC-100, der vom Reinheitsgrad der applizierten Lösung abhängt.

typischen Stoffgruppe der Taxanderivate (Diterpenpolyalkohole und -polyester) zuzuordnen ist. So isolierten – auf ähnliche Weise wie hier beschrieben – z. B. MC LAUGHLIN et al. (1981) aus *Taxus wallichiana* 3 Substanzen, die sie als Taxanderivate identifizierten und geben nach Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel im System Chloroform-Methanol (9:1) den R_f -Wert 0,35 an. Des weiteren sind UV-Absorptionsmaxima im Bereich von 220–230 und 260–280 nm typisch für Taxanderivate (SENILH 1984).

Die Frage nach der Identität des gefundenen Wirkstoffes kann letztlich nur mit Methoden der analytischen Chemie geklärt werden.

4.2 Wirkungsmechanismus

Aufgrund der bei Viertlarven auftretenden Schädigungen sind folgende Wirkungsweisen der Substanz denkbar:

1. Cytotoxische Effekte führen zumindest in bestimmten Teilen des larvalen Fettkörpers zur Zelldesintegration. Dies hat die Störung entscheidender Stoffwechselfunktionen und damit die irreversible Unterbrechung der Larvalentwicklung zur Folge.

2. Die Störungen der postlarvalen Häutungen sind Sekundäreffekte cytotoxischer Ereignisse. Partielle oder völlige Dysfunktion von Epidermis- oder Fettkörperzellen könnte die Bildung von pupaler und imaginaler Cuticula behindern, die hormonelle Regulation stören oder den Bewegungsapparat pathologisch verändern.

Der Befund, daß nur orale Applikation eine biologische Wirkung erzielt, deutet darauf hin, daß der Wirkstoff im Verdauungstrakt oder während der Darmpassage metabolisiert wird und erst als Metabolit seine Wirkung entfaltet. Möglicherweise sind ältere, aber noch fressende Dritt- und Viertlarven mit ihrer völligen Unempfindlichkeit nicht mehr in der Lage zu metabolisieren.

Danksagung

Ich danke den Professoren Dr. SEIFERT, Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie, Universität Gießen, und Dr. SCHMUTTERER, Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie, Universität Gießen, für ihre freundliche Unterstützung. Dr. ERMEL und Dr. XYLANDER danke ich für die Korrektur des Manuskriptes. Diese Arbeit wurde von der BASF finanziell gefördert.

Zusammenfassung

Extrakte aus *Taxus baccata* L. und *Taxus baccata* cv. *fastigiata* Loud. hatten insektizide Wirkung auf Dritt- und Viertlarven von *Epilachna varivestis*. Puppen- und Imaginalhäutung wurden gestört. Wirkungen waren nur nach oraler Applikation zu erzielen. Die Aufarbeitung von methanolischen Rohextrakten durch Vorreinigung, 2 Säulenchromatographien und semipräparative Dünnschichtchromatographie führte zur Isolierung der biologisch aktiven Substanz. Der Wirkstoff konnte nach Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60 mit dem Laufmittel Chloroform-Methanol (88:12) im UV₂₅₄ und durch Vanillin-Schwefelsäure bei einem R_f -Wert von 0,35 nachgewiesen werden. Sein UV-Absorptionsspektrum (Methanol) zeigte Maxima bei 228 und 264 nm. Seine Retentionszeit nach HPLC an einer RP-18 Säule (5 µm LiChroSpher, 4 × 250 mm) mit dem Laufmittel Acetonitril-Wasser (45:55) war 3,20 min. Die Zuordnung der Substanz zur Gruppe der Taxanderivate und ihre Wirkung als Folge cytotoxischer Ereignisse werden diskutiert.

Literatur

- AUTERHOFF, H.; KOVAR, K.-A., 1977: Identifizierung von Arzneistoffen, Stuttgart: Wiss. Verlagsges.
 FEUERHAKE, K.; SCHMUTTERER, H., 1982: Einfache Verfahren zur Gewinnung und Formulierung von Nimsamen und deren Wirkung auf verschiedene Schadinsekten. Z. Pflkrank. Pflschutz. **88** (12), 737–747.
 FROHNE, D.; PRIBILLA, O., 1965: Tödliche Vergiftungen mit *Taxus baccata*. Arch. Tox. **21**, 120–132.
 GRAF, E., 1958: Taxin B, das Hauptalkaloid von *Taxus baccata* L. (4. Mitteilung Taxus-Alkaloide). Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges. **291**, 443–449.
 GRAF, E.; BERTHOLDT, H.; BOEDEKER, H.; JOHANNESSEN, B.; ROSHA, R., 1963: Stand der Kenntnis des Taxins. Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin Kl. Chem. Geol. Biol. **4**, 389–394.

- HARBORNE, J. B., 1984: Phytochemical methods. London New York: Chapman and Hall.
- HEGNAUER, R., 1962: Chemotaxonomie der Pflanzen. Basel und Stuttgart: Birkhäuser Verlag. Bd. 1.
- 1986: Chemotaxonomie der Pflanzen. Basel, Boston und Stuttgart: Birkhäuser Verlag. Bd. 7 (Nachtr. zu Bd 1 und 2).
- HOFFMANN, J. A.; HETRU, C., 1983: Ecdysonone. In: Endocrinology of insects. Ed. by DOWNER, R. G. H.; LAUFER, H. New York: Alan R. Liss. pp. 65–88.
- HOFFMEISTER, H.; HEINRICH, G.; STAAL, G. B.; VAN DER BURG, J., 1967: Über das Vorkommen von Ecdysteron in Eiben. Naturwissenschaften 54 (17), 470–471.
- KHAN, M. S. Y.; KUMAR, I.; PRASAD, J. S.; NAGARAJAN, G. R.; PARTHASARATHY, M. R.; KRISHNAMURTY, H. G., 1976: Phenolic constituents of *Taxus baccata* leaves. Planta Med. 30 (1), 82–85.
- MCLAUGHLIN, J. L.; MILLER, R. W.; POWELL, R. G.; SMITH JR., C. R., 1981: 10-Hydroxybaccatin II, 10-Deacetylcephalomannine, and 10-Deacetyltaxol: New antitumore taxanes from *Taxus wallichiana*. J. Nat. Prod. 44 (3), 312–319.
- MILLER, R. W., 1980: A brief survey of *Taxus* alkaloids and other taxane derivatives. J. Nat. Prod. 43 (4), 425–437.
- MORELLI, I., 1976: Constituents of *Taxus baccata* L. Fitoterapia 47 (1), 31–38.
- ROTH L., DAUNDERER, M.; KORMANN, K., 1984: Giftpflanzen-Pflanzengifte, Landsberg (München): ecomed. Verlagsges.
- SCHANNÉ, C., 1987: Darstellung von Eiben-Extrakten und ihre Wirkung auf *Epilachna varivestis* Muls. Nachr. der DGaaE 1 (2), 32.
- SCHMIDT, G., 1953: Zur Frage der insektiziden Wirksamkeit von *Taxus*-Extrakten. Nachr. d. deutsch. Pflanzenschutzdienstes 5, 124–125.
- SCHULTE, T., 1975: Lethal intoxication with leaves of the yew tree. Arch. Toxicol. 34 (2), 153–158.
- SCHUSTER, R., 1982: Untersuchungen über die Wirkung von Extrakten aus *Taxus baccata* L., *Dryopteris filix-mas* L. und *Pteridium aquilinum* L. auf Fraß und Entwicklung von *Epilachna varivestis* Muls. Dipl.-Arb. Univ. Gießen.
- SEHNIL, V.; BLECHERT, S.; COLIN, M.; GUENARD, D.; PICOT, D.; POTIER, P.; VARENNE, P., 1985: Mise en evidence de nouveaux analogues du taxol extraits de *Taxus baccata*. J. Nat. Prod. 47 (1), 131–137.
- STEETS, R., 1976: Die Wirkung von Inhaltsstoffen aus Meliaceen und Anacardiaceen auf Coleopteren und Lepidopteren. Diss. Univ. Gießen.
- TAKEMOTO, R.; OGAWA, S.; NISHIMOTO, N.; HOFFMEISTER, H., 1967: Steroide mit Häutungshormonaktivität aus Tieren und Pflanzen. Z. Natforsch. 22b, 681–682.
- WRIGHT, J. E.; SPATES, G. E., 1972: Laboratory evaluation of compounds to determine juvenile hormone activity against the stable fly *Stomoxys calcitrans*. J. Econ. Entomol. 65 (5), 1346–1349.

Anschrift des Verfassers: C. SCHANNÉ, Stephanstraße 24, D-6300 Gießen