

# Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych.

## Rozdział barwników roślinnych.

---

Regulamin porządkowy pracy w laboratorium w Katedrze Biochemii.

1. Do udziału w zajęciach laboratoryjnych dopuszczeni są studenci/uczniowie po przeszkoleniu w zakresie BHP w związku z wykonywaniem czynności na salach ćwiczeń w Katedrze Biochemii. Udział w szkoleniu musi być zakończony pisemnym potwierdzeniem studenta/ucznia.
2. W sali ćwiczeń obowiązuje kategoriyczny zakaz spożywania pokarmów i napojów.
3. Do sali ćwiczeniowej grupę studentów/uczniów wprowadza prowadzący ćwiczenia.
4. W pracowniach obowiązkowe jest noszenie odzieży ochronnej, odzież wierzchnią należy pozostawić w szatni.
5. Wszelkiego rodzaju torby, plecaki itp. nie powinny utrudniać poruszania się po laboratorium – nie należy ich również przechowywać w trakcie zajęć na stołach laboratoryjnych.
6. Na każde ćwiczenie studenci/uczniowie otrzymują wyposażenie obejmujące zestawy odczynników niezbędnych do przeprowadzenia doświadczeń, szkło laboratoryjne, pipety automatyczne, spektrofotometry i inne przyrządy laboratoryjne. Po zakończeniu pracy student/uczeń jest zobowiązany do uporządkowania swojego stanowiska pracy oraz umycia szkła laboratoryjnego.
7. Odczynniki chemiczne, które znajdują się pod wyciągiem, nie mogą być przenoszone na stoły laboratoryjne, należy korzystać z nich w miejscu przechowywania.
8. Wszystkie urządzenia elektryczne, mechaniczne itp. należy używać zgodnie z zaleceniami osoby prowadzącej ćwiczenia.
9. Zabrania się uruchamiania urządzeń bez zgody prowadzącego ćwiczenia.
10. Zapalanie palników gazowych może odbywać się z należytą ostrożnością po uzyskaniu zgody prowadzącego ćwiczenia.

# Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych.

## Rozdział barwników roślinnych.

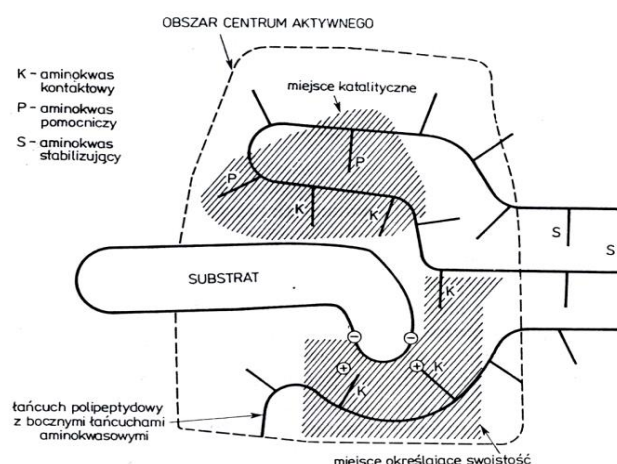
### A. Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych na przykładzie fosfatazy kwaśnej.

Celem ćwiczenia jest wykazanie, że temperatura oraz obecność inhibitora wpływają na szybkość reakcji enzymatycznych.

#### Wiadomości wstępne

Reakcje biochemiczne przebiegające w komórkach organizmów żywych wymagają udziału biokatalizatorów, czyli enzymów. Enzymy to wyspecjalizowane białka wykazujące zdolności katalityczne. Enzymy przyspieszają reakcje chemiczne, które spontanicznie przebiegają tak wolno, że praktycznie nie można ich wykryć. Znane są też reakcje katalizowane przez cząsteczki RNA, zwane rybozymami lub oligonukleotydowe fragmenty DNA o właściwościach katalitycznych, tzw. DNA-zymy.

Większość poznanych enzymów zaliczamy do białek złożonych, zbudowanych z części białkowej, czyli apoenzymu i kofaktora, którym może być jonu metalu lub drobnocząsteczkowy związek organiczny, zwany grupą prostetyczną (koenzymem). Kofaktory współdziałają z apoenzymem w procesie katalizy, przenoszą protony i elektrony, grupy funkcyjne itp. Substancja przekształcana przez enzym nosi nazwę substratu (S). W czasie katalizy enzym (E) wiąże się z substratem (S) tworząc nietrwały kompleks enzym-substrat (ES) rozpadający się do produktu reakcji i wolnego enzymu. Enzym nie zużywa się czasie reakcji, dzięki czemu jedna cząsteczka może przekształcić wiele cząsteczek substratu. Ponadto, enzymy charakteryzują się wysoką specyficnością w stosunku do substratów, działają w rozcieńczonych roztworach, w łagodnych warunkach pH i temperatury, przy niskich wartościach ciśnienia. Najważniejszą dla przemian metabolicznych właściwością enzymów jest to, że ich aktywność podlega precyzyjnej regulacji. W wiązaniu substratu i przekształcaniu go w produkt uczestniczy specyficzny obszar białka enzymu nazywany centrum aktywnym lub miejscem aktywnym. W tworzeniu centrum aktywnego uczestniczą te aminokwasy, których łańcuchy boczne zawierają grupy funkcyjne o charakterze



Rys.1. Budowa centrum aktywnego enzymu według Koshlanda ( D.E.Koshland 1960 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 22. zmieniony).

# Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych.

## Rozdział barwników roślinnych.

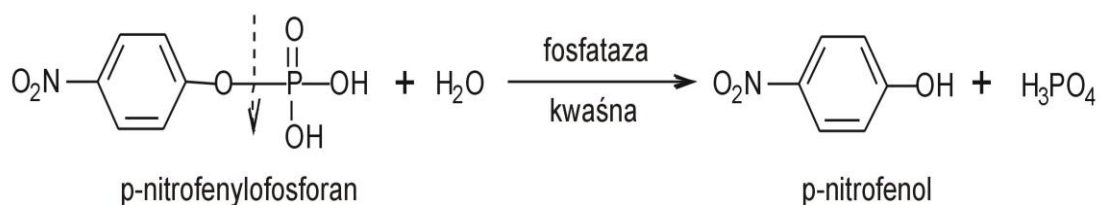
donorów i/lub akceptorów elektronów (grupy karboksylowe w łańcuchach bocznych kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego, grupa aminowa w łańcuchu bocznym aminokwasu lizyny) lub grupy funkcyjne o charakterze polarnym: hydroksylowe (-OH) aminokwasów seryny lub treoniny, hydrosulfidowe (-SH) występujące w cząsteczce aminokwasu cysteiny (rys.1). Miejsce aktywne, zazwyczaj jest obszarem niedostępnym dla cząsteczek wody, co sprzyja silniejszemu wiązaniu substratu. Przyłączenie substratu przez enzym zachodzi głównie z udziałem słabych wiązań chemicznych (jonowych, wodorowych) i oddziaływań chemicznych (oddziaływania hydrofobowe, siły van der Waalsa). Wszystkie dotychczas poznane enzymy zostały podzielone na sześć klas: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy i ligazy w zależności od typu katalizowanej reakcji.

Miarą aktywności enzymu jest ilość substratu przekształconego w jednostce czasu lub ilość produktu powstałego w jednostce czasu, często przeliczona na ilość badanego materiału. Aktywność enzymu wyraża się w jednostkach aktywności. Jednostka uniwersalna (standardowa) to taka ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1  $\mu$ mola substratu w ciągu 1 min., w temperaturze 30°C i optymalnych warunkach pH oraz stężenia substratu.

Procesy metaboliczne przebiegają z udziałem wielu enzymów a szybkość ich działania zależy od aktywności tych enzymów. Za syntezę białek enzymatycznych odpowiada aparat genetyczny, ale sama kontrola genetyczna nie zapewnia ciągłości przemian biochemicznych. Inną drogą kontroli reakcji biochemicznych jest modulacja aktywności już funkcjonujących enzymów. Na przebieg reakcji enzymatycznych wpływa wiele czynników chemicznych i fizycznych, takich jak stężenie enzymu, stężenie substratu, temperatura, stężenie jonów wodorowych (pH), aktywatory oraz inhibitory.

### Wprowadzenie

Na zajęciach zbadamy wpływ temperatury oraz inhibitora na aktywność fosfatazy kwaśnej wyizolowanej z bulwy ziemniaka. Fosfatazy kwaśne, działające w zakresie pH od 4,0 do 7,0 należą do klasy hydrolaz. Katalizują reakcje odłączania reszty fosforanowej od monoestrów fosforanowych różnych związków naturalnych. Aktywność fosfatazy kwaśnej ziemniaka będzie oznaczana z wykorzystaniem syntetycznego substratu, p-nitrofenylofosforanu. Produktami reakcji hydrolizy substratu są p-nitrofenol i reszta kwasu fosforowego, zgodnie z reakcją (rys.2):



Rys.2. Reakcja hydrolizy p-nitrofenylofosforanu katalizowana przez fosfatazę kwaśną.

Jeden z produktów reakcji, p-nitrofenol przyjmuje w środowisku zasadowym barwę żółtą. Intensywność zabarwienia prób po przerwaniu reakcji enzymatycznej świadczy o ilości wytworzonego produktu. Stężenie produktu jest miarą aktywności fosfatazy kwaśnej.

# Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych.

## Rozdział barwników roślinnych.

### 1. Wpływ temperatury na aktywność enzymów

Reakcja enzymatyczna zachodzi wtedy, gdy reagujące cząsteczki zderzą się ze sobą z odpowiednią energią kinetyczną. Niska temperatura hamuje działanie enzymów z powodu niskiej energii kinetycznej reagujących ze sobą cząsteczek substratu i cząsteczek enzymu. Reakcja enzymatyczna przyspiesza wraz z podwyższeniem temperatury, ponieważ wzrost temperatury zwiększa energię kinetyczną reagujących cząsteczek. W temperaturze optymalnej szybkość reakcji enzymatycznej jest największa. Dalsze zwiększanie temperatury powoduje obniżenie szybkości reakcji wynikające z denaturacji termicznej białka enzymu.

#### Wykonanie

W celu oznaczenia aktywności fosfatazy kwaśnej oraz wykazania wpływu temperatury na szybkość reakcji enzymatycznej do odpowiednio oznakowanych probówek należy odmierzyć następujące objętości odczynników:

1) Próba pełna, temperatura reakcji 4°C	2) Próba pełna, temperatura reakcji 30°C	3) Próba materiałowa, temperatura reakcji 30°C
0,5 ml ekstraktu enzymu	0,5 ml ekstraktu enzymu	0,5 ml ekstraktu enzymu
1,5ml buforu Tris-octan pH 5,5	1,5ml buforu Tris-octan pH 5,5	2,0 ml buforu Tris-octan pH 5,5
Wstawić probówki do łaźni o odpowiednich temperaturach na 3 min., a następnie nie wyjmując probówek z łaźni do prób pełnych dodać:		
0,5 ml p-nitrofenylofosforanu	0,5 ml p-nitrofenylofosforanu	-----
Po wymieszaniu probówek, reakcję prowadzić jeszcze przez 15 min. przetrzymując próby w odpowiednich temperaturach. Następnie przerwać reakcję dodając do wszystkich probówek po:		
2,5 ml 0,1M NaOH	2,5 ml 0,1M NaOH	2,5 ml 0,1M NaOH
Po zakończeniu reakcji zmierzyć absorbancję prób pełnych przy długości fali 420 nm w fotometrze ustawionym na zero wobec próby materiałowej.		

### 2. Wpływ inhibitorów na aktywność enzymów

Zjawisko hamowania aktywności enzymów z udziałem drobnocząsteczkowych substancji (inhibitorów) nazywamy inhibicją. Inhibitorami enzymów mogą być metabolity komórkowe lub substancje obce dla organizmu, tzw. ksenobiotyki. Wyróżniamy inhibicję nieodwracalną, w której inhibitor łączy się z enzymem silnym wiązaniem kowalencyjnym oraz inhibicję odwracalną: kompetycyjną i niekompetycyjną. Inhibitor kompetycyjny przyłącza się w centrum aktywnym enzymu blokując jego działanie. Zazwyczaj inhibitor kompetycyjny jest cząsteczką o strukturze chemicznej podobnej do właściwego substratu. Zwiększenie stężenia substratu znosi hamujące działanie inhibitora. Natomiast inhibitor niekompetycyjny przyłącza się do już utworzonego kompleksu ES lub do wolnego enzymu, ale w miejscu innym niż centrum aktywne. Inhibitor niekompetycyjny blokuje powstanie produktu reakcji enzymatycznej. Zastosowany na ćwiczeniu molibdenian amonu jest inhibitorem kompetycyjnym fosfataz kwaśnych.

# Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych.

## Rozdział barwników roślinnych.

### Wykonanie

W celu wykazania wpływu inhibitorów na szybkość reakcji enzymatycznej do odpowiednio oznakowanych probówek należy odmierzyć następujące objętości odczynników:

1) Próba pełna, reakcja z inhibitorem	2) Próba pełna, reakcja bez inhibitora	3) Próba materiałowa
0,5 ml ekstraktu enzymu	0,5 ml ekstraktu enzymu	0,5 ml ekstraktu enzymu
1,25 ml buforu Tris-octan pH 5,5	1,5ml buforu Tris-octan pH 5,5	2,0 ml buforu Tris-octan pH 5,5
0,25 ml molibdenianu amonu	-----	-----
Wstawić probówki do łaźni o temperaturze 30° C na 3 min., a następnie nie wyjmując probówek z łaźni dodać po:		
0,5 ml p-nitrofenylofosforanu	0,5 ml p-nitrofenylofosforanu	-----
Po wymieszaniu probówek, reakcję prowadzić jeszcze przez 15 min. w temperaturze 30°C. Następnie przerwać reakcję dodając do wszystkich probówek po:		
2,5 ml 0,1M NaOH	2,5 ml 0,1M NaOH	2,5 ml 0,1M NaOH
Po zakończeniu reakcji zmierzyć absorbancję prób pełnych przy długości fali 420 nm w fotometrze ustawionym na zero wobec próby materiałowej.		

### Opracowanie wyników

Obliczyć aktywność fosfatazy kwaśnej stosując wzór:

$$\text{Aktywność fosfatazy kwaśnej } (\mu\text{mole p-nitrofenolu} \times \text{min}^{-1}) = \frac{A_{420}}{0,002 \times 139 \times 15 \text{ min.}}$$

gdzie:

$A_{420}$  - absorbancja dla każdej probówki zmierzona w fotometrze przy długości fali 420 nm;

0,002 - współczynnik absorbancji dla 1  $\mu\text{g}$  p-nitrofenolu;

139 - masa 1  $\mu\text{mola}$  p-nitrofenolu;

15 min - czas trwania reakcji enzymatycznej.

Tak obliczoną aktywność enzymu wyrażamy w  $\mu\text{molach}$  p-nitrofenolu powstałego w czasie 1 min. Następnie dokonać interpretacji wyników. Porównać aktywność fosfatazy kwaśnej w różnych temperaturach, a także przy braku i w obecności inhibitora.

### Literatura

1. Olczak Mariusz. 1996. Kwaśne fosfatazy roślin wyższych. Wiadomości Botaniczne 40 (2), 39-51.
2. Kwinta Joanna. 2011. Czynniki warunkujące aktywność enzymów na przykładzie fosfatazy kwaśnej. Red. Wiesław Bielawski i Barbara Zagdańska, Przewodnik do ćwiczeń z biochemii, str. 77-89. Wydawnictwo SGGW.

# Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych.

## Rozdział barwników roślinnych.

---

### ***B. Rozdział barwników roślinnych metodą cienkowarstwowej chromatografii adsorpcyjnej.***

Celem ćwiczenia jest poznanie metody cienkowarstwowej chromatografii adsorpcyjnej i jej zastosowania do rozdzielania barwników roślinnych.

#### **Wiadomości wstępne**

Chromatografia to fizykochemiczna metoda rozdzielania mieszanin, których składniki ulegają zróżnicowanemu podziałowi pomiędzy dwie fazy, fazę ruchomą i stacjonarną. Jeżeli fazą ruchomą jest gaz, to chromatografia nosi nazwę gazowej, gdy ciecz, wówczas nazywana jest cieczą. Fazą stacjonarną może być ciało stałe bądź ciecz, osadzona na stałym nośniku. Faza ruchoma przepływając przez fazę stacjonarną powoduje migrację poszczególnych składników mieszaniny. Składniki te przemieszczają się z różną szybkością wynikającą z ich odmiennego powinowactwa do adsorbenta, swoistego powinowactwa do ligandu, z różnic w ich masie cząsteczkowej, z różnic w wypadkowym ładunku, bądź z różnej rozpuszczalności warunkach określonych warunkach rozdziału. Stąd, ze względu na naturę oddziaływań fizykochemicznych będących podstawą rozdziału wyróżniamy pięć podstawowych metod chromatograficznych: chromatografię adsorpcyjną, powinowactwa, sita molekularnego, jonowymienną i podziałową. Ze względu na technikę prowadzenia rozdziału wyróżniamy natomiast chromatografię kolumnową, w której faza stacjonarna umieszczana jest w kolumnie, lub chromatografię planarną, w której faza stacjonarna umieszczana jest na płaszczyźnie (chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa).

#### **Wprowadzenie**

W chromatografii cienkowarstwowej rozdział mieszaniny substancji wykonuje się na cienkich warstwach nośnika osadzonych na płytkach szklanych, plastikowych lub aluminiowych. W zależności od zastosowanego nośnika, rozdział może mieć charakter chromatografii adsorpcyjnej, podziałowej lub jonowymiennej.

Chromatografia adsorpcyjna opiera się na zjawisku adsorpcji, czyli nagromadzeniu cząsteczek rozdzielanych substancji na powierzchni adsorbenta za pomocą słabych oddziaływań fizykochemicznych. W czasie przesuwania się fazy ruchomej po powierzchni adsorbenta (faza stacjonarna), substancje słabo adsorbujące się przesuną się na większą odległość niż substancje silnie adsorbowane. Stopień adsorpcji rozdzielanych substancji na adsorbencie uzależniony jest od natury chemicznej i właściwości adsorbentu, rozdzielanych substancji oraz fazy ruchomej. Adsorbentem jest, nierozpuszczalna w stosowanym układzie rozpuszczalników, wysokoporowata substancja. Adsorbenty można podzielić na dwie zasadnicze grupy, tj. polarne, np. żel krzemionkowy, tlenek glinowy, i niepolarne, np. węgiel aktywny, talk. Fazę ruchomą stanowi najczęściej rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników o różnych stopniach polarności, od węglowodorów po alkohole i kwasy organiczne.

Najczęściej stosowanym adsorbentem jest żel krzemionkowy - kwas krzemowy, którego aktywność uwarunkowana jest obecnością na jego powierzchni grup hydroksylowych. Grupy te mogą tworzyć wiązania wodorowe z polarnymi grupami rozdzielanych substancji. Termiczna aktywacja żelu (110°C) przed rozdziałem ma na celu usunięcie z jego powierzchni wody blokującej grupy hydroksylowe. Na polarnym adsorbencie zachodzi silna adsorpcja substancji o charakterze

# Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych.

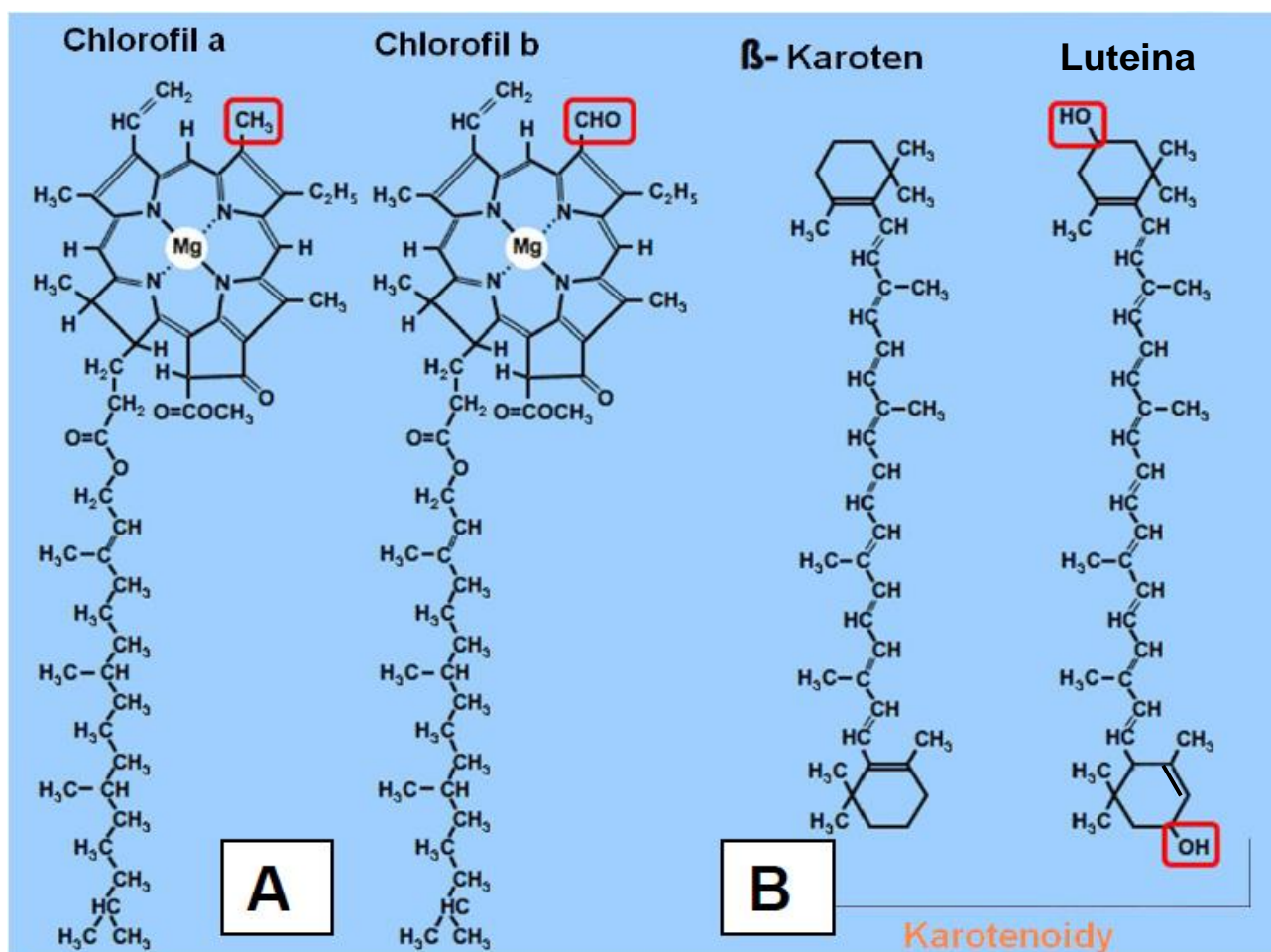
## Rozdział barwników roślinnych.

polarnym, a bardzo słaba substancji niepolarnych, stąd droga migracji substancji bardziej polarnej jest mniejsza w stosunku do drogi którą pokonuje substancja mniej polarna, słabiej adsorbowana. Stopień adsorpcji danej substancji na powierzchni adsorbentu rośnie wraz ze wzrostem liczby polarnych grup funkcyjnych oraz ilości podwójnych wiązań występujących w adsorbowanej cząsteczce.

Prędkość wędrówki poszczególnych składników mieszaniny, czyli odległość, na jaką przesunęły się one od miejsca startu w określonym czasie, wyraża się podobnie jak w chromatografii podziałowej, tzw. *współczynnikiem przesunięcia* ( $R_f$ ):

$$R_f = \frac{\text{przesunięcie badanej substancji}}{\text{przesunięcie czoła rozpuszczalnika}}$$

**Barwniki roślinne** to związki nierozpuszczalne w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. Należą do nich chlorofile oraz karotenoidy (Rys. 4). W zielonych liściach najwięcej jest chlorofilu i to one maskują barwę karotenoidów. Ze względu na charakter budowy (brak lub obecność polarnych grup funkcyjnych) i długość łańcuchów węglowych w cząsteczce, barwniki roślinne różnią się znacznie polarnością.



Rys. 3. Wzory strukturalne podstawowych barwników roślinnych: chlorofilu (A) oraz karotenoidów (B).

# Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych.

## Rozdział barwników roślinnych.

---

**Chlorofile** są to związki porfiryne zbudowane z 4 pierścieni pirolowych połączonych mostkami metinowymi. Atomy azotu pierścieni pirolowych są związane z centralnie położonym atomem magnezu. Charakterystyczną cechą chlorofili jest także obecność fitolu, hydrofobowego 20-węglowego alkoholu, związanego estrowo z grupą propionową jednego z pierścieni (III). Chlorofil *b* różni się tym od chlorofilu *a*, że grupa metylowa przy atomie C jednego z pierścieni (II) jest zastąpiona grupą aldehydową.

**Karotenoidy** to barwniki roślinne z grupy tetraterpenów. Należą do nich pomarańczowe karoteny oraz żółte ksantofile. W liściach głównym składnikiem karotenoidowym jest  $\beta$ -karoten, którego cząsteczka na obu końcach zawiera pierścienie  $\beta$ -jononu. Oba pierścienie połączone są długim łańcuchem węglowodorowym, w którym występują na przemian wiązania pojedyncze i podwójne. Ksantofile są to utlenione pochodne karotenów, zawierające w pierścieniach jononu grupy hydroksylowe, karbonylowe lub karboksylowe. Najpowszechniej występującym ksantofilem jest luteina.

**W warunkach ćwiczenia**, wyekstrahowane z roślin za pomocą acetonu barwniki zostaną naniesione w postaci mieszaniny na płytkę chromatograficzną pokrytą warstwą żelu krzemionkowego i rozdzielone w камерze zawierającej układ rozpuszczalników - eter naftowy: aceton (7:3). Do rozdzielania barwników zostanie wykorzystana *technika wstępująca* rozwijania chromatogramu, w której rozpuszczalnik podsiąka od dołu żelu do góry dzięki działaniu sił kapilarnych. Podczas rozwijania chromatogramu, poszczególne związki barwne będą się przemieszczać z różną prędkością i ułożą się w następującej kolejności od góry płytki: karoteny o barwie pomarańczowej (ciemnożółtej), feofityna (chlorofil, w którym Mg zastąpiony jest przez 2 atomy H) o barwie oliwkowobrunatnej, chlorofil *a* o barwie niebieskozielonej, chlorofil *b* o barwie żółtozielonej oraz najbardziej polarne z rozdzielanych barwników ksantofile - luteina, wiolaksantyna i neoksantyna o barwie żółtej.

### Wykonanie

**1. Przygotowanie wyciągu z liści.** Odważyć 1g liści pietruszki, rozetrzeć w moździerzu, dodać 3 ml acetonu i znowu rozcierać szybko tak, aby nie wyparował aceton. Zawartość moździerza przesączyć przez mały zwitek waty, umieszczony w lejku, do suchej kalibrowanej probówki. Ewentualnie przepłukać sącdek niewielką objętością acetonu, aby końcowa objętość ekstraktu wynosiła 3 ml. Probówkę szczelnie zamknąć parafilmem.

**2. Nanoszenie ekstraktu barwników na płytki z adsorbentem.** Ekstrakt barwników (60 $\mu$ l) nanosić na wcześniej przygotowaną płytkę chromatograficzną o wymiarach 2,3  $\times$  7,5 cm z żelem krzemionkowym bardzo małymi kroplami w postaci pasma przyjmując, że linia startu jest oddalona 1 cm od krawędzi dolnej płytki i 0,5 cm od krawędzi bocznych. Preparat nanosić mikropipetą w trzech porcjach (3  $\times$  20 $\mu$ l), za każdym razem kolejną porcję ekstraktu nanieść dopiero po wyschnięciu poprzedniej. Uważać, aby podczas nakraplania ekstraktu nie naruszyć warstwy żelu końcówką mikropipety !!!

**3. Rozwijanie chromatogramu.** Po wyschnięciu naniesionego ekstraktu, płytkę wstawić pionowo do kamery zawierającej 4,5 ml mieszaniny rozpuszczalników i przykryć pokrywą. Linia naniesionych barwników musi znajdować się powyżej poziomu mieszaniny rozpuszczalników, w przeciwnym razie barwniki będą przechodziły do roztworu. Zwrócić uwagę, aby płytka w камерze



# Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych.

## Rozdział barwników roślinnych.

---

była ustawiona w pozycji możliwie dokładnie pionowej, i nie opierała się o ściany komory jedną z krawędzi bocznych, gdyż powoduje to nierównomierne wznoszenie się układu rozwijającego. Rozwijanie chromatogramu trwa ok. 20-30 minut. Płytkę wyjąć z kamery w momencie, kiedy czoło rozpuszczalnika dojdzie na odległość 0,5 cm od górnego końca płytki, i suszyć w temperaturze pokojowej przez kilka minut pod włączonym wyciągiem.

### **Opracowanie wyników**

Przedyskutować schemat ułożenia pasm barwników na rozwiniętym chromatogramie oraz podać ich zabarwienie.

### Literatura

1. Kacprzak F., Klimek B., Kwapińska H. 1969. Chromatografia barwników. WN-T.
2. Sherma J., Lippstone G. S. 1964. Chromatography of chloroplast pigments on preformed thin layers. J. Chrom. A 41, 220-227
3. Witkiewicz Z. 2000. Podstawy chromatografii. WN-T.
4. Zdunek-Zastocka E. 2011. Rozdział barwników roślinnych metodą cienkowarstwowej chromatografii adsorpcyjnej. Red. W. Bielawski, B. Zagdańska, Przewodnik do ćwiczeń z biochemii, str. 28-31. Wydawnictwo SGGW.