

Elektrokemijska karakterizacija vitamina B12

Jovanović, Anamaria

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:094894>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-03**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Anamaria Jovanović

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA VITAMINA B12

Diplomski rad

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Anamaria Jovanović

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA VITAMINA B12

Diplomski rad

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

Komentorica: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Neposredni voditelj: Dominik Goman, mag. chem.

Osijek, 2023.

*Ovaj rad prezentiran je na 14th International Scientific and Professional Conference
WITH FOOD TO HEALTH, 14-15. rujna 2023.*

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, izv. prof. dr. sc. Martini Medvidović-Kosanović, komentorici doc. dr. sc. Anamariji Stanković i neposrednom voditelju mag. chem. Dominiku Gomanu prije svega na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada, pomoći tijekom rada u laboratoriju i tijekom pisanja rada, uloženom trudu, strpljenju i suradnji tijekom izrade ovog rada!

Hvala mojim prijateljima koji su me bodrili i poticali u mojim padovima i usponima, bili najbolje društvo u tuzi i veselju. Posebno hvala kolegici, odnosno prijateljici Ivani koja je bila uz mene svaki korak tijekom izrade diplomskog rada, ali i sve godine ovog studija!

Veliko hvala mojem Nikoli na ljubavi i podršci tijekom studiranja, strpljenju, motivaciji, utjesi u teškim i veselju u sretnim trenucima!

Najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji, posebno mojim roditeljima i bratu koji su mi pomogli i omogućili studiranje. Hvala Vam što ste uvijek uz mene i što ste vjerovali u mene!

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**Odjel za kemiju****Diplomski studij kemije****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA VITAMINA B12****Anamaria Jovanović****Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović**Sažetak**

U ovom diplomskom radu ispitivana su elektrokemijska svojstva vitamina B12 cikličkom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Cilj rada bio je ispitati utjecaj pH, brzine polarizacije elektrode i koncentracije vitamina B12 na njegova oksido-redukcijska svojstva, istražiti moguću adsorpciju vitamina B12 na površinu radne elektrode te detektirati vitamin B12 u realnom uzorku. Elektrokemijska mjerenja provedena su u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji s radnom elektrodom od staklastog ugljika, referentnom Ag/AgCl elektrodom i platinskom žicom kao protuelektrodom. Ciklički voltamogrami ispitivanog vitamina B12 pokazali su jedan oksidacijski strujni vrh koji odgovara oksidaciji Co^{2+} u Co^{3+} te jedan redukcijski strujni vrh koji odgovara redukciji Co^{3+} u Co^{2+} . Utvrđeno je da je oksidacija Co^{2+} u Co^{3+} adsorpcijski kontroliran proces dok redukcija Co^{3+} u Co^{2+} difuzijski kontroliran proces jer je logaritam struje anodnog i katodnog strujnog vrha linearna funkcija logaritma brzine polarizacije elektrode (nagib pravca je oko 1 za anodni i oko 0,5 za katodni strujni vrh). Diferencijalni pulsni voltamogrami pokazali su da je anodni strujni vrh vitamina B12 linearna funkcija koncentracije u rasponu koncentracije od $1,00 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} do $1,2 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} . Diferencijalnom pulsnom voltametrijom također je detektiran vitamin B12 u realnom uzorku kapsula B-kompleksa.

Diplomski rad obuhvaća: 44 stranice, 25 slika, 3 tablice, 35 literaturnih navoda.**Jezik izvornika:** hrvatski**Ključne riječi:** vitamin B12 / ciklička voltometrija / diferencijalna pulsna voltometrija / redukcija/ oksidacija / realni uzorak**Rad je prihvaćen:** 10.10.2023.**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. izv. prof. dr. sc. Tomislav Balić, predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, mentorica i članica
3. Doc. dr. sc. Anamarija Stanković, komentorka i članica
4. Doc. dr. sc. Olivera Galović, zamjena člana

Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF VITAMIN B12

Anamaria Jovanović

Thesis completed at: Department of Chemistry

Supervisor: Ph.D. Martina Medvidović-Kosanović, Assoc. Prof.

Abstract

In this diploma thesis, the electrochemical properties of vitamin B12 were determined by cyclic and differential pulse voltammetry. The aim of this study was to investigate the influence of pH, scan rate and concentration of vitamin B12 on its oxido-reduction properties, to study the possible adsorption of vitamin B12 on the working electrode surface and to detect vitamin B12 in a real sample. Electrochemical measurements were performed in a three-electrode electrochemical cell with a working glassy carbon electrode, reference Ag/AgCl electrode, and platinum wire counter electrode. The cyclic voltammograms of vitamin B12 have shown one oxidation peak which corresponds to the oxidation of Co^{2+} to Co^{3+} and one reduction peak which corresponds to a reduction of Co^{3+} to Co^{2+} . It was determined that the oxidation of Co^{2+} to Co^{3+} is an adsorption-controlled process, while the reduction of Co^{3+} to Co^{2+} is a diffusion-controlled process, because the logarithm of the anodic and cathodic current peaks is a linear function of the logarithm of the electrode polarization speed (the slope of the line is about 1 for the anodic and about 0.5 for the cathodic peak current). Differential pulse voltammograms have shown that the anodic peak current of vitamin B12 was a linear function of concentration in a concentration range from $1.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ till $1.2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Differential pulse voltammetry was used to detect Vitamin B12 in a real sample of B-complex capsules.

Thesis includes: 44 pages, 25 figures, 3 tables, 35 references.

Original in: Croatian

Keywords: vitamin B12 / cyclic voltammetry / differential pulse voltammetry / reduction / oxidation / real sample

Thesis accepted: 10.10.2023.

Reviewers:

1. Tomislav Balić, PhD, Associate professor
2. Martina Medvidović Kosanović, PhD, Associate professor
3. Anamarija Stanković, PhD, Assistant professor
4. Olivera Galović, PhD, Assistant professor

Thesis deposited: at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. VITAMIN B12.....	2
2.1.1. Struktura vitamina B12	3
2.1.2. Biokemijske reakcije vitamina B12	4
2.1.3. Funkcija i izvori vitamina B12.....	7
2.1.4. Nedostatak vitamina B12	10
2.1.5. Metode za karakterizaciju vitamina B12.....	11
2.2. ELEKTROKEMIJSKE METODE	12
2.2.1. Voltometrija	13
2.2.2. Diferencijalna pulsna voltometrija	16
2.2.3. Ciklička voltometrija	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	19
3.1. KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA	19
3.2. ELEKTROKEMIJSKA ĆELIJA	21
3.3. PRIPRAVA REALNOG UZORKA	24
3.4. METODE.....	25
3.4.1. Ispitivanje topljivosti vitamina B12	25
3.4.2. Ciklička voltometrija	26
3.4.3. Diferencijalna pulsna voltometrija	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA.....	27
4.1.1. <i>Utjecaj brzine polarizacije</i>	27
4.2. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA	31
4.2.1. <i>Ispitivanje adsorpcije</i>	31
4.2.2. <i>Ispitivanje utjecaja pH</i>	32
4.2.3. <i>Ispitivanje utjecaja koncentracije</i>	34
4.3. ANALIZA REALNOG UZORKA.....	38
4.3.1. <i>Diferencijalna pulsna voltometrija</i>	38
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATURA.....	41
7. ŽIVOTOPIS	44

1. UVOD

Vitamin B12 jedan je od vitamina B kompleksa, esencijalan vitamin topiv u vodi. Vitamin koji se u organizam unosi putem hrane, a najviše je prisutan u hrani životinjskog podrijetla. U ljudskom organizmu ima značajnu ulogu, što ga čini zanimljivim za brojna znanstvena istraživanja, pa tako i za ovaj rad.

Cilj rada bio je ispitati elektrokemijska svojstva vitamina B12 u odgovarajućem otapalu pomoću voltametrijskih metoda (cikličke i diferencijalne pulsne voltametrije). Pomoću navedenih metoda praćen je utjecaj brzine polarizacije elektrode, pH i utjecaj koncentracije na potencijal i struju oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha vitamina B12. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom je također ispitana adsorpcija oksidacijskog produkta vitamina B12 na površinu radne elektrode te je detektiran vitamin B12 u realnom uzorku.

U prvom dijelu rada, odnosno u Literaturnom pregledu opisana su svojstva, reakcije i glavna obilježja vitamina B12; strukturu, biokemijske reakcije i ulogu u organizmu. Također, opisane su elektrokemijske metode koje su korištene u radu. Drugi dio rada, odnosno Eksperimentalni dio sadrži korištene kemikalije, postupke pripreme otopina i realnog uzorka, korištene metode i instrumente te uvjete pri kojima su provedena elektrokemijska mjerenja. U trećem dijelu Rezultati i rasprava dobiveni eksperimentalni rezultati su prikazani i interpretirani. Četvrti dio rada je Zaključak koji je napisan na temelju rezultata.

2. LITERATURNI PREGLED

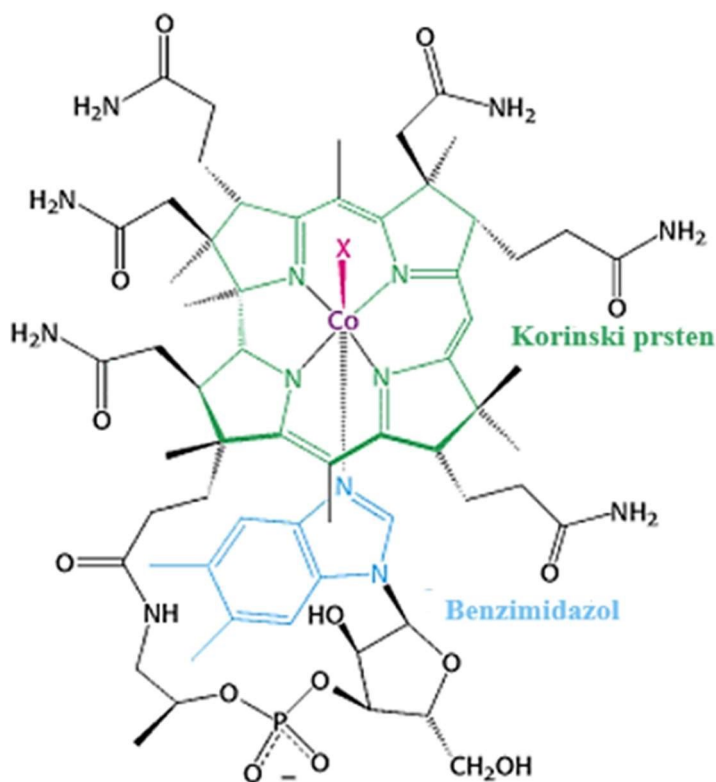
2.1. VITAMIN B12

Drugi naziv vitamina B12 je kobalamin. Vitamin B12 je crveni kristaličan prah, bez okusa i mirisa, esencijalan vitamin topiv u vodi i jedan od vitamina B kompleksa. Vitamin B12 pripada skupini korinoida, spojeva čiju osnovu čini korin, međutim postoje brojni drugi korinoidi koji nemaju vitaminsku aktivnost. Vitamin B12 je kompleksna molekula čiji aktivni dio sadrži Co ion koji dolazi u tri oksidacijska stanja I, II i III [1]. U molekulama kobalamina Co najčešće postoji u Co(III) stanju, međutim, pri različitim pH vrijednostima, centar kobalta se reducira u Co(II) ili čak u Co(I) stanje, koje se obično označava kao reducirano odnosno super-reducirano [2]. Sam naziv vitamin B12 odnosi se na skupinu kemijski sličnih spojeva, odnosno spojeva koji imaju sličnu biološku aktivnost, a to su cijanokobalamin, hidroksokobalamin, adenzilkobalamin i metilkobalamin. Cijanokobalamin je oblik vitamina B12 koji se nalazi u lijekovima i dodacima prehrani, dok se adenzilkobalamin, metilkobalamin i hidroksokobalamin nalaze u hrani. Identificirano je još nekoliko kobalamina, no njihova fiziološka uloga još nije točno poznata [1].

Vitamin B12 prvi put je identificiran kao hranjiva tvar ili vanjski čimbenik kroz istraživanje 1920-ih te se pokazalo da se simptomi perniciozne anemije (megaloblastične anemije) mogu prevladati dodavanjem jetre u prehranu [3, 4]. To je otkriveno tako što je hranjiva tvar izolirana iz uzoraka jetre nakon dodatka cijanida i ekstrakcije u organsko otapalo, iz kojeg je kristalizirana da bi se otkrila prisutnost tamnocrvenog pigmenta [5]. Struktura spoja riješena je primjenom rendgenske kristalografije, otkrivajući da je vitamin bio cijanolirani tetrapirrol koji sadrži kobalt [6]. Posljedično, nazvan je cijanokobalamin i stoga se tehnički B12 posebno odnosi na cijanokobalamin [7].

2.1.1. Struktura vitamina B12

Struktura vitamina B12 (Slika 1.) zapravo sliči strukturi porfirina. Jezgra vitamina B12 sastoji se od korinskog prstena sa središnjim kobaltovim atomom, gdje korinski prsten sadrži 4 pirolske jedinice. Četiri od šest koordinacijskih mjesta zauzimaju pirolski atomi dušika. Peti supstituent vezan na kobaltov atom je derivat dimetilbenzimidazola koji sadrži ribozu, koja veže i fosfat, time povezuje ovaj nukleotid s jednom od sedam amidnih skupina korinskog prstena. Šesto koordinacijsko mjesto mogu zauzeti razni ligandi: CN^- cijano skupina, OH^- hidroksilna skupina ili H_2O ovisno o pH, CH_3 metilna skupina, deoksiadenozilna skupina tvoreći redom, cijanokobalamin, hidroksokobalamin, akvakobalamin, metilkobalamin i 5 – deoksiadenozilkobalamin [1, 7, 8].

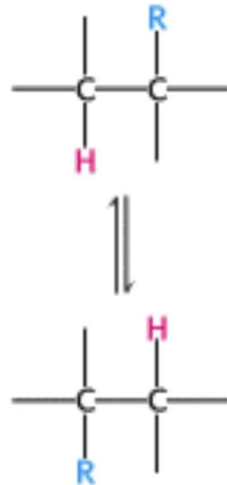


Slika 1. Struktura vitamina B12, gdje su supstituenti $\text{X} = : \text{CN}^-$, OH^- , H_2O , CH_3 ili deoksiadenozilna skupina [9].

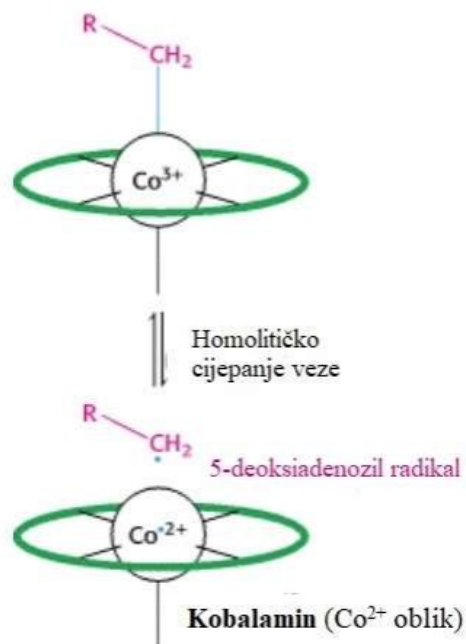
Kao nutrijent vitamin B12 djeluje ili kao kofaktor ili koenzim u brojnim bitnim biokemijskim procesima. Biokemija vitamina B12 vrti se oko kemijskih procesa koji se odvijaju preko središnjeg iona kobalta, gdje ion kobalta ima posebnu sposobnost formiranja izravne veze kobalt-ugljik. Kemijski sastav odražava sposobnost kobalta da se mijenja između različitih oksidacijskih stanja, Co(I), Co(II) i Co(III), kako se oksidacijsko stanje kobalta mijenja, tako se i koordinacija metala mijenja s četiri na šest. Odnosno, od ovih oksidacijskih stanja Co(I) je najnestabilniji i ponaša se kao supernukleofil. Korinski prsten konstruiran je tako da stabilizira takav oblik [7, 10]. Kobalaminski enzimi koji su prisutni u većini organizama, kataliziraju tri vrste reakcija: 1. intramolekulske pregradnje, 2. metiliranja, kao u sintezi metionina i 3. redukciju ribonukleotida u deoksiribonukleotide. Kod sisavaca su poznate samo dvije reakcije u kojima je potreban koenzim B12. Prva reakcija se odnosi na prevođenje L-malonil-CoA u sukcinil-CoA, a druga na stvaranje metionina metiliranjem homocisteina. Posljednja reakcija je posebno važna jer je metionin potreban za stvaranje koenzima koji sudjeluju u sintezi purina i timina koji su potrebni za sintezu nukleinskih kiselina [8].

2.1.2. Biokemijske reakcije vitamina B12

Reakcije pregradnje katalizirane koenzimom B12 su izmjene dviju skupina vezanih na susjedne atome ugljika (Slika 2.). Atom vodika migrira s jednog atoma ugljika na sljedeći, a skupina kao što je -CO-S-CoA (skupina metilmalonila CoA) istodobno se kreće u obrnutom smjeru. Prvi korak u intramolekulskim pregradnjama je cijepanje veze ugljik-kobalt 5-deoksiadenozilkobalamina da nastane oblik koenzima B12 (Co^{2+}) i 5'-deoksiadenozil radikal, ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_3$). U navedenoj reakciji homolitičkog cijepanja, jedan elektron Co-C veza ostaje na Co (reducirajući ga iz +3 u +2 oksidacijsko stanje, Slika 3.), dok drugi elektron ostaje s atomom ugljika, stvarajući slobodni radikal. Nasuprot tome, gotovo sve druge reakcije cijepanja u biološkim sustavima su heterolitičke, gdje se elektronski par prenosi na jedan od dva atoma koji su zajedno povezani [8, 9].

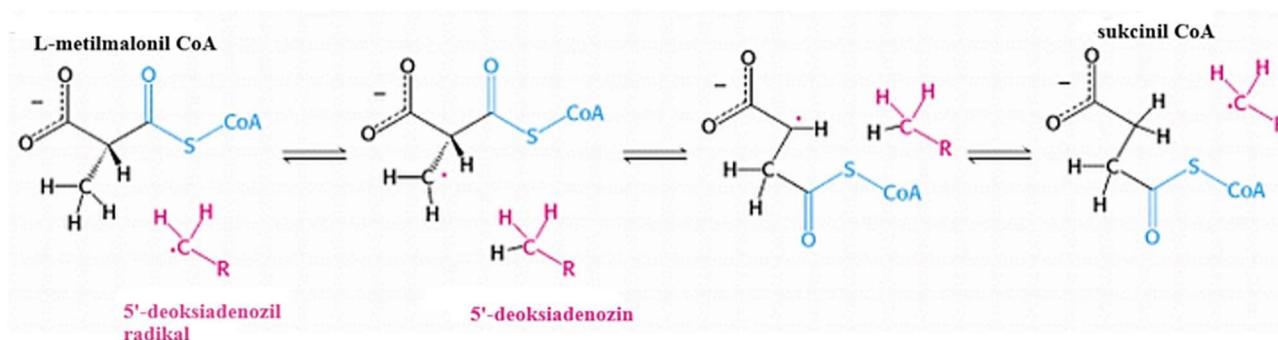


Slika 2. Reakcija pregradnje katalizirana enzimima kobalamina (vitamina B12). R skupina može biti amino skupina, hidroksilna skupinu ili supstituirani ugljik [9].



Slika 3. Stvaranje 5'-deoksiadenozil radikala, reakcija metilmalonil CoA mutaze počinje s homolitičkim cijepanjem veze koja povezuje Co^{3+} s ugljikom riboze adozinskog dijela. Cijepanje stvara 5'-deoksiadenozil radikal i dovodi do redukcije Co^{3+} u Co^{2+} [9].

Uloga vrlo neobičnog $C_{10}H_{12}N_5O_3$ radikala (5'-deoksiadenozil radikala) je slijedeća: izdvaja se atom vodika iz supstrata (oduzima supstratu elektron) te nastaje 5'-deoksiadenozin i supstratni radikal (Slika 4.). Nastali supstrat radikal spontano se preuređuje i karbonylna skupina CoA migrira na položaj koji je prethodno zauzimao H atom na susjednom atomu ugljika i nastaje novi radikal. Tako nastali radikal produkta izdvaja atom vodika iz metilne skupine 5'-deoksiadenozina i dovršava pregradnju te vraća deoksiadenozilnu jedinicu u radikalni oblik. Uloga koenzima B12 u takvim intramolekulskim pregradnjama je da služi kao izvor slobodnih radikala potrebnih za apsorpciju vodikovih atoma. Bitno svojstvo koenzima B12 je mala stabilnost njegove veze kobalt-ugljik, čije lagano cijepanje stvara radikale. Kako bi se olakšalo cijepanje ove veze, enzimi poput metilmalonil CoA mutaze istiskuju benzamidazolsku skupinu iz kobalta i koordiniraju kobalamin preko histidinskog ostatka. Slabljenju veze kobalt-ugljik pridonosi i steričko ometanje ili zaklanjanje (eng. *steric crowding*) u korinskom prstenu [8, 9].



Slika 4. Stvaranje sukcinil CoA reakcijom pregradnje. Prilikom pregradnje metilmalonil CoA u sukcinil CoA slobodni radikal oduzima vodikov atom [9].

Uz reakciju pregradnje L-metilmalonil CoA u sukcinil CoA još jedna reakcija, od dvije reakcije ovisna o B12 za koje se zna da se odvijaju u sisavcima, je stvaranje metionina metiliranjem homocisteina. Tetrahydrofolat može nositi metilnu skupinu na svom atomu N-5, ali njegov prijenos potencijala nije dovoljno visok za većinu metiliranja u biosintezi. Umjesto toga, za većinu takvih reakcija donor je obično S-adenozilmetionin (SAM), koji nastaje prijenosom adenozilne skupine iz molekule ATP-a na sumporov atom metionina. Metilna skupina metioninske jedinice aktivira se pozitivnim nabojem na susjednom atomu sumpora, što čini molekulu puno reaktivnijom od N 5-metiltetrahydrofolata. S-adenozilhomocistein nastaje

pri raspadu trifosfatne skupine molekule ATP na pirofosfat i ortofosfat, gdje se pirofosfat potom hidrolizira u dva ortofosfata. Zatim se prijenosom metilne na neki akceptor stvara S-adenozilhomocistein. S-adenozilhomocistein se zatim hidrolizira u homocistein i adenzin. Metionin se može regenerirati prijenosom metilne skupine na homocistein iz N-5 metiltetrahidrofolata, reakcija katalizirana metionin-sintazom (također poznata kao homocistein-metiltransferaza). Koenzim koji sudjeluje u ovom prijenosu metilne skupine je metilkobalamin, oblik vitamina B12. Ove reakcije čine aktivirani metilni ciklus. Metilne skupine ulaze u ciklus u pretvorbi homocisteina u metionin i zatim postaju vrlo reaktivne dodatkom adenzilnih skupina, koje čine pozitivno nabijeni atomi sumpora, a metilne skupine su puno elektrofilnije. Visok potencijala omogućava metilnoj skupini prijenos na široku paletu akceptora. Među akceptorima modificiranim S-adenozilmetioninom su specifične baze u DNA. Metilacija DNA štiti bakterijske DNA od cijepanja restrikcijским enzimima [8, 9].

2.1.3. Funkcija i izvori vitamina B12

Kao što je već ranije spomenuto vitamin B12 je potreban u organizmu za biokemijske reakcije, gdje ima ulogu koenzima, odnosno za pretvorbu homocisteina u metionin, uz to ima ulogu u zaštiti DNA i RNA. Također vitamin B12 ima ulogu u zaštiti živčanih i moždanih stanica, te krvožilnog sustava gdje pridonosi sazrijevanju crvenih krvnih stanica, povećava energiju i podržava imunološki sustav, stimulira proizvodnju serotonina i pridonosi održavanju pozitivnog raspoloženja. Vitamin B12 mogu sintetizirati određene bakterije, međutim kod ljudskog organizma glavni izvor vitamina B12 je prehrana. Iako neki sisavci, osobito preživači mogu apsorbirati svoj vitamin B12 iz crijevnih bakterija koje žive u njihovim crijevima. Ljudi također imaju bogatu mikrobnu faunu, prisutnu uglavnom u debelom crijevu. Međutim, ljudski organizam ne dobiva vitamin B12 iz crijevnih bakterija već se akceptori za vitamin B12 nalaze u tankom crijevu. Kako ljudi trebaju vitamin B12 za dva enzima i budući da imaju tendenciju zadržati i reciklirati svoj B12, dnevne potrebe za B12 su vrlo niske [7]. Pravilna apsorpcija vitamina B12 zahtijeva odgovarajuće količine želučane kiseline, a procijenjeno je kako organizam apsorbira tek oko 1% od sveukupnoga unesenog vitamina B12. Stoga stariji ljudi imaju manjak vitamina B12 jer se starenjem smanjuje količina želučane kiseline koja je u ovom slučaju potrebna za apsorpciju [11]. Dnevna potreba za vitaminom B12 je oko 2,5 µg, što je najmanje od svih vitamina. Prema hrvatskom Pravilniku o dodacima prehrani propisane su

preporučene dnevne doze unosa vitamina B12 u obliku dodataka prehrani za odrasle od 2,5 µg do najviše 9 µg, dok za trudnice i dojilje preporučene doze iznose 3,5 µg i 4 µg [12]. Za osobe koje teže apsorbiraju vitamin B12 dnevna doza unosa treba biti puno viša kako bi tijelo dobilo potrebnu količinu. Vitamin B12 je topljiv u vodi i njegovo izlučivanje se odvija putem urina, te veće količine od preporučenog dnevnog unosa ne predstavljaju opasnost od hipervitaminoze. Upravo zbog te činjenice stručnjaci savjetuju povišenje preporučenog dnevnog unosa za 400 µg na dan, jer ne predstavlja opasnost za zdravlje već može dovesti do sprečavanja ozbiljnijih bolesti. Međutim, uz takvo povišenje dovode se u pitanje popratni troškovi vezani uz dodatke prehrani [11].

Vitamin B12 se u najvećoj količini nalazi u životinjskim proizvodima, obogaćenoj hrani i dodacima prehrani. Dobri prehrambeni izvori vitamina B12 su prije svega životinjskog porijekla, a uključuju meso, posebice jetru, ribu, školjke, jaja i mliječne proizvode (u Tablici 1. prikazane su namirnice i masa vitamina B12). Vegetarijanci, točnije vegani, skloni su nedostatku vitamina B12 zbog nekonzumiranja životinjskih proizvoda. Voće i povrće ne sadrži vitamin B12, ali male količine vitamina B12 koje se mogu pronaći u biljnoj hrani potječu od mikrobne kontaminacije iz gnojiva ili od nitrofikacijskih bakterija iz korijenskih kvržica u slučaju mahunarki. Međutim, neke alge, žitarice, kvasac i fermentirana biljna hrana (tofu) sadrže vitamin B12, ali ne u značajnim količinama. Zbog toga se vegetarijancima i veganima, trudnicama, dojiljama i drugim osobama koje su u opasnosti od nedostatka preporučuje uzimanje dodataka prehrani koji sadrže vitamin B12. Sintetizirani vitamin B12 može se pronaći u obogaćenoj hrani poput energetskih pića i energetskih pločica ili u već spomenutim dodacima prehrani koji se mogu pronaći u obliku tableta, prahova, gela ili spreja. Većina ljudi na zdravoj raznolikoj prehrani nije sklona nedostatku vitamina B12, ali nedostatak B12 je mnogo češći od očekivanog [7, 11].

Tablica 1. Sadržaj vitamina B12 u određenoj hrani [13, 14].

Hrana	Porcija	masa B12 po porciji /μg
Goveđa jetra (kuhana, pržena)	85,05 g	70,7
Školjke (kuhane)	85,05 g	17,0
Prehrambeni kvasac	32 g	8,3 do 24,0
Losos (kuhani)	85,05 g	2,6 do 4,9
Tuna (konzervirana)	85,05 g	2,5
Govedina (kuhana, pečena)	85,05 g	2,4 do 1,5
Nemasni obični grčki jogurt	170,10 g	1,3 do 1,0
Mlijeko, 2% mliječne masti	240 ml	1,3 do 1,2
Jaje, cijelo (kuhano)	1 veće	0,6 do 0,5
Pileća prsa (pečena)	85,05 g	0,3

U hrani životinjskog podrijetla vitamin B12 se najčešće nalazi u obliku adenozi kobalamina i hidroksokobalamina u mesu, jetri, jajima, ribi i morskim plodovima, mlijeku i mliječnim proizvodima. Metilkobalamin se najčešće nalazi u mlijeku i mliječnim proizvodima i smatra se fiziološki aktivnim oblikom vitamina B12 te najučinkovitijim oblikom. Metilkobalamin je oblik koji može prijeći krvno-moždanu barijeru, te se nalazi u krvnoj plazmi, u tekućem dijelu citoplazme i cerebralno-spinalnoj tekućini, zbog čega je izuzetno potreban za normalno funkcioniranje živčanog sustava. Cijanokobalamin može se pronaći u manjim količinama u bjelanjku i kuhanom bakalaru, dok se sintetski najčešće nalazi u dodacima prehrani. Cijanokobalamin je fiziološki neaktivan oblik, te se najprije mora pretvoriti u aktivne oblike metilkobalamina i 5-deoksiadenozilkobalamina da bi ga organizam mogao koristiti [11, 15].

2.1.4. Nedostatak vitamina B12

Aktivni oblici vitamina B12, adenzilkobalamin i metilkobalamin važni su za dva metabolička puta koji u organizmu imaju ključnu ulogu te je njihov nedostatak odgovoran za kliničke dijagnoze bolesnika. Nedostatak vitamina B12 moguć je u svim razdobljima života, a najrizičnije skupine su trudnice, novorođenčad i dojenčad, vegetarijanci i vegani, starije osobe, bolesnici s gastrointestinalnim i bubrežnim bolestima. Vitamin B12 iznimno je važan u fetalnom i dojenačkom razdoblju za normalan rast i razvoj djeteta te za normalan razvoj središnjeg živčanog sustava. Prehrambeni nedostatak vitamina B12 zbog nekonzumiranja namirnica životinjskog podrijetla, koje su najvažniji izvor vitamina B12, jedan je od glavnih uzroka nedostatka vitamina B12 u mlađih odraslih osoba i siromašnih ljudi. Nedostatak vitamina B12 može biti povezan i s genetskim poremećajima sa sustavom unosa i distribucije hranjivih tvari. Simptomi nedostatka su obično vrlo nespecifični i često se teško prepoznaju [16]. Novijim istraživanjima otkriveni su novi receptori, enzimi i druge bjelančevine i geni koji sudjeluju u apsorpciji, prijenosu i unutarstaničnom metabolizmu vitamina B12. Nova otkrića uvelike su pomogla boljem razumijevanju poremećaja vezanih uz nedostatak vitamina B12 i otkrivanju bolesti povezanih s nedostatkom B12. Utvrđeno je da je najranija i najbolja dijagnostika za otkrivanje nedostatka vitamina B12 i praćenja učinkovitosti liječenja holotranskobalamin, dok se praćenje koncentracije ukupnog vitamina B12 u plazmi smatra relativno neosjetljivom metodom. Metilmalonska kiselina i homocistein neposredni su pokazatelji nedostatka aktivnih oblika vitamina B12. Simptomi nedostatka B12 kod odraslih kreću se od megaloblastične anemije, neuroloških problema, kardiovaskularnih simptoma, metilmalonske acidurije, a uključuju umor, osjetnu neuropatiju, atrofični glositis, makrocitozu ili hipersegmentaciju neutrofila i hemolitičku anemiju. Također uz nedostatak vitamina B12 mogu biti povezani simptomi depresije, senilnosti, Alzheimerova bolest, moždani udar i Parkinsonova bolest, dok su simptomi kod djece poremećaji u rastu i razvoju, teškoće pokreta i megaloblastična anemija [7, 16-19].

2.1.5. Metode za karakterizaciju vitamina B12

Brojne se analitičke i instrumentalne metode koriste za karakterizaciju, odnosno određivanje koncentracije i detektiranje vitamina B12. Osim toga, postoje različite tehnike za odvajanje i pripremu uzoraka koje se koriste u različitim metodama mjerenja [20]. Spektrofotometrijske metode koriste se za analizu vitamina B12 uz različite tipove ultraljubičastih UV-Vis spektrofotometara ili su dodani neki reagensi kao 6,7-dimetoksi-1-metil 2(1H)-kinoksalin-3-propionil karboksilna kiselina hidrazin (DMEQ) za proizvodnju visoko fluorescentnog vitamina B12. U UV-Vis spektrofotometriji, vodene otopine vitamina B12 pokazuju tri apsorpcijska maksimuma pri valnim duljinama 278 nm, 361 nm i 550 nm. Međutim, spektrofotometrijske metode u složenim uzorcima vitamina B12 nisu najpogodnije jer nisu dovoljno osjetljive [20, 21]. Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom ICP-MS (eng. *Inductive-coupled plasma (ICP) - mass spectrometry (MS)*) jedna je od najboljih metoda za određivanje koncentracije vitamina B12 zbog svoje brzine, osjetljivosti, potpune automatizacije te velike mogućnosti primjene. Masena spektrometrija jedna je od najvažnijih instrumenata za rutinske i istraživačke primjene. Međutim, kod masene spektrometrije analizu je potrebno započeti s čistim analitom da bi se mogle koristiti različite MS vrste. Stoga je važno masenu spektrometriju kombinirati s drugim tehnikama kao što su kapilarna elektroforeza, HPLC, plinska kromatografija i tekućinska kromatografija, kako bi se vitamin B12 u ljudskom urinu ili otopinama multivitaminskih tableta mogao pretvoriti u slobodne ione kobalta u kiselom mediju. MS se često koristi u farmakologiji, industriji i istraživanjima, ali se ne koristi u kliničkom području zbog svoje visoke cijene. Atomska apsorpcijska spektroskopija AAS (eng. *Atomic absorption spectroscopy*) također se koristi za određivanje vitamina B12 u farmaceutskim uzorcima. Glavne prednosti ove metode su visoka propusnost uzorka i visoka preciznost. Međutim, glavni nedostaci su manja osjetljivost, velike količine uzorka potrebnog za analizu i problemi s lomom. Još jedna metoda koja se koristi je plamena atomska apsorpcijska spektrometrija FAAS (eng. *Flame atomic absorption spectrometry*) [20]. Kromatografske metode se također koriste za analizu uzoraka koji sadrže vitamin B12, točnije tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti HPLC (eng. *High-performance liquid chromatography*). HPLC metoda pogodna je za određivanje vitamina B12 u farmakologiji, industriji i istraživanjima, a najčešće se koristi HPLC obratnih faza na C18 koloni odnosno RP-HPLC (eng. *Reversed phase-High-performance liquid chromatography*). HPLC metode su vrlo selektivne, ali su izrazito dugotrajne i složene metode. Kapilarna elektroforeza CE (eng.

Capillary electrophoresis) ima veću moć razlučivanja od tradicionalne elektroforeze i ne zahtijeva iznimno velike vještine poput HPLC. CE je kvantitativna, a ne polukvantitativna ili kvalitativna metoda te se mogu koristiti vrlo male količine uzorka. CE se može koristiti za odvajanje i detekciju vitamina B12 između različitih oblika vitamina B12. Sve navedene metode imaju i prednosti i nedostatke, a zajedničko im je da su poprilično složene metode, odnosno metode koje imaju složene i skupe instrumente. Upravo zbog toga, elektrokemijske metode su vrlo jednostavne, selektivne i osjetljive i zbog toga su sve češće primjenjive metode za detekciju vitamina B12 u uzorcima. Elektrokemijske metode su jednostavne za upotrebu uz pristupačnost instrumenta, potrebna je minimalna priprema uzorka za analizu i moguće je analizirati veći broj uzoraka u kraćem vremenskom razdoblju. U ovom radu su korištene elektrokemijske metode, ciklička voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija za karakterizaciju vitamina B12 [21-24].

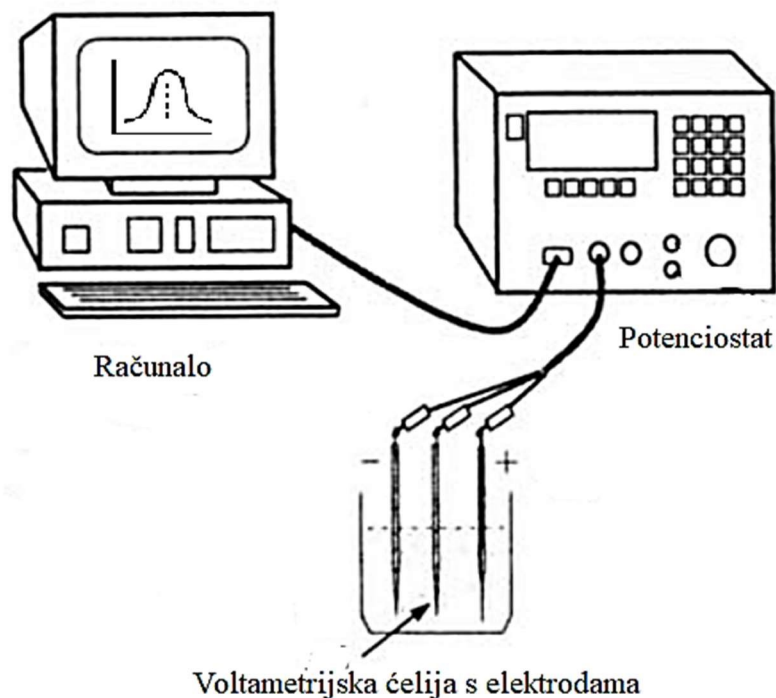
2.2.ELEKTROKEMIJSKE METODE

Elektrokemija je grana kemije koja povezuje električne i kemijske utjecaje, odnosno proučava kemijske promjene uzrokovane prilikom prolaska električne struje. Elektrokemijske metode uključuju skupinu analitičkih tehnika temeljenih na mjerenju struje, naboja ili potencijala te se koriste za karakterizaciju kemijske reaktivnosti analita i određivanje koncentracije. Kod elektrokemijskih metoda mjerenja se izvode u elektrokemijskoj ćeliji u koju su uronjene najmanje dvije elektrode u otopinu elektrolita. Jedna od elektroda je radna elektroda i to je elektroda koja daje odziv na analit, dok je druga elektroda referentna elektroda koja ima konstantan potencijal. U svim elektrokemijskim metodama kemijska reakcija se odvija na radnoj elektrodi. Rezultat elektrokemijskih reakcija je signal odziva, čije mjerenje daje traženi analitički ili drugi podatak o analitu. Signal odziva nastaje pod utjecajem signala pobude ili može biti posljedica prisutnosti određenih molekularnih vrsta u otopini. Odabir elektrode ovisi uglavnom o dva čimbenika: redoks potencijalu tvari koja se mjeri i pozadinskoj struji u rasponu potencijala potrebnom za mjerenje. Drugi čimbenici koji mogu utjecati na izbor radne elektrode uključuju: dostupnost, vodljivost, toksičnost, mehanička svojstva i raspoloživi raspon potencijala. U elektrokemijske metode svrstavaju se: voltometrija, potenciometrija,

konduktometrija, kulometrija i dielektrometrija. Navedene metode karakteriziraju točnost, selektivnost, osjetljivost, preciznost, pristupačna cijena i dostupnost instrumenata [25-27].

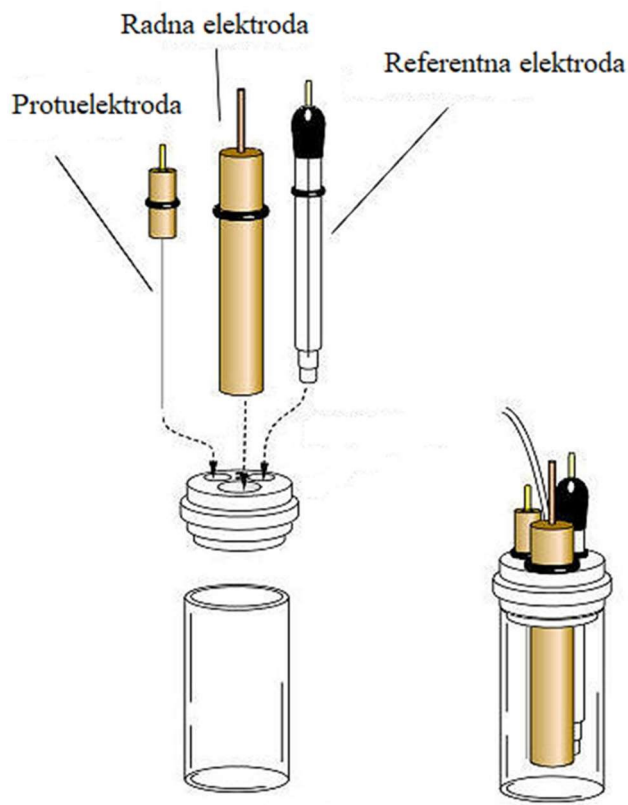
2.2.1. Voltometrija

Voltometrijske metode su skupina elektroanalitičkih metoda koje se temelje na mjerenju jakosti struje (signal odziva) u ovisnosti o električnom naponu (signal pobude) uz izazivanje polarizacije radne elektrode. Voltometrijske metode primjenjuju se za kvantitativnu analizu organskih i anorganskih tvari u vodenom ili ne vodenom mediju, za određivanja redoks potencijala, mehanizma redoks reakcija, ispitivanje kinetike i u elektrokemijskoj detekciji eluiranih analita u HPLC-u. Vrste voltometrijskih metoda su: diferencijalna pulsna, ciklička, stripping i pravokutnovalna voltometrija te različite polarografske metode koje za razliku od voltometrijskih metoda radne elektrode imaju u obliku kapajuće živine elektrode. Voltometrijske metode su osjetljive, imaju široki raspon koncentracijskog područja za određivanje ispitivanog uzorka, široki temperaturni raspon kod analiza, pružaju mogućnost analiza kod različitih elektrolita, otapala i matrica te imaju mogućnost određivanja različitih analita u isto vrijeme. Voltometrijski sustav se sastoji od potencioštata, računala i elektrokemijske ćelije s elektrodama, a to prikazuje Slika 5. Potenciostat kontrolira potencijal između radne i referentne elektrode i mjeri struju između radne i protuelektrode. Računalo zatim uz pomoć odgovarajućih programa prikazuje rezultate mjerenja u obliku voltamograma. Voltamogram je grafički prikaz jakosti struje kao funkcije potencijala između radne i referentne elektrode [25, 28].



Slika 5. Sustav za voltametrijska mjerenja sastoji se od voltametrijske ćelije, potenciostata i računala [29].

Voltametrijska ćelija sastoji se od tri elektrode uronjene u otopinu koja sadrži inertni elektrolit i analit (Slika 6.). Elektrode koje se koriste u voltametriji su: referentna elektroda (RE eng. *Reference electrode*), protuelektroda (CE eng. *Counter electrode*) i radna elektroda (WE eng. *Working electrode*). Na radnu elektrodu se dovodi promjenjivi potencijal (signal pobude) te se na njoj odvijaju redoks reakcije uz potencijal zadanih vrijednosti. Referentna elektroda je elektroda sa stalnim potencijalom, a protuelektroda je ta koja omogućava tok električne struje kroz ćeliju. Kad se odviše oksidacija ispitivanog uzorka na radnoj elektrodi, električna struja prolazi elektronima kroz vanjski električni krug do protuelektrode, gdje dolazi do redukcije otapala ili neke druge tvari prisutne u otopini matrice. Da bi se analit reducirao na radnoj elektrodi, potreban je izvor elektrona, tj. električna struja koja teče od protuelektrode do katode. Mjeri se struja između protuelektrode i radne elektrode, odnosno signal odziva, a kontrolira se potencijal između radne i referentne elektrode, odnosno signal pobude [30].

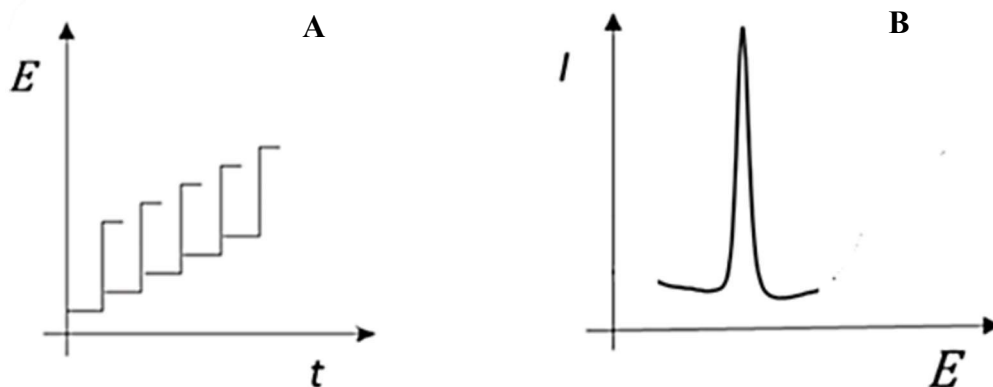


Slika 6. Troelektrodna voltametrijska ćelija: protuelektroda, radna i referentna elektroda [31].

Radne elektrode najčešće su manjih dimenzija da bi se spriječila razgradnja analita elektrolizom te povećala sklonost prema polarizaciji. Kao referentne elektrode koriste se sve vrste referentnih elektroda, a najčešće se koristi zasićena kalomelova elektroda ili srebro-srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda. Protuelektroda je najčešće platinska žica ili cilindrična elektroda od platinske mrežice koja se nalazi unutar cilindra radne elektrode te ona zatvara strujni krug u elektrokemijskoj ćeliji. Protuelektrode su najčešće napravljene od materijala kao što su platina ili grafit zato što takvi materijali neće ugroziti rad radne elektrode. Elektrokemijske ćelije uz elektrode sadrže i cjevčicu za uvođenje inertnog plina za uklanjanje otopljenog kisika i kako bi se osigurala inertna atmosfera nad otapalom [28, 30].

2.2.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

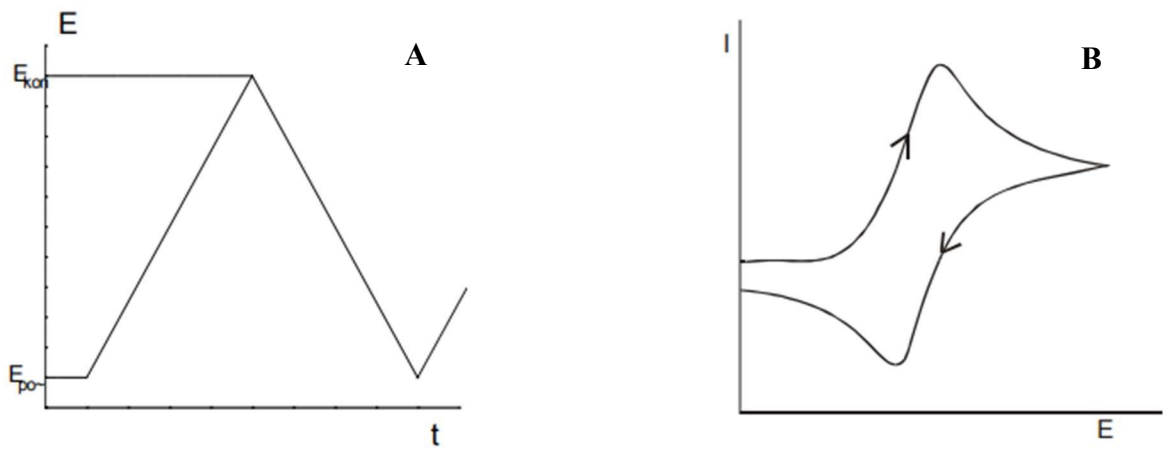
Diferencijalna pulsna voltametrija (DPV eng. *Differential Pulse Voltammetry*) je voltametrijska metoda visoke osjetljivosti koja se koristi za određivanje niskih koncentracija elektroaktivnih komponenta u različitim uzorcima. Granica detekcije diferencijalno pulsne voltametrije je do 10^{-8} mol dm^{-3} . Uzorci se uzimaju tijekom određenog razdoblja kako bi se utvrdio odnos potencijala napona, struje i vremena da bi se odredila promjena potencijala u ovisnosti o vremenu. Princip rada diferencijalno pulsne voltametrije je slijedeći, pulsevi koje šalje radna elektroda obično su između 10 ms i 100 ms s postupnim povećanjem od 10 mV do 100 mV. Kako se puls vraća na osnovni napon, postoji tipično vrijeme mirovanja od 1-2 s tako da protuelektroda samo prima struju. Dakle, primjenom kratkih pulseva na radnu elektrodu mjeri se jakost struje prije primjene pulsa (I_1) i zatim na kraju pulsa (I_2) što daje razliku ($\Delta I = I_2 - I_1$) koja se označuje kao funkcija potencijala i prikazuje se u obliku diferencijalnog pulsnog voltamograma. Područje potencijala kod kojeg mala promjena potencijala radne elektrode uzrokuje razliku u struji ćelije koju je moguće izmjeriti nastat će pulsno voltamogramski odziv u obliku strujnog vrha. Visina strujnog vrha proporcionalna je koncentraciji ispitanog analita. Pojavom jednog ili više strujnih vrhova označava se signal odziva (Slika 7.B), a niz kratkotrajnih pulseva označava signal pobude (Slika 7.A). Za mehanizam rada diferencijalno pulsne voltametrije potrebne su najmanje dvije elektrode (radna i protuelektroda). Protuelektroda prenosi pulseva napona, dok radna elektroda mjeri pripadajuću struju. Referentna elektroda kao treća elektroda kontrolira napon protuelektrode [32].



Slika 7. A) Prikaz signala pobude i **B)** signala odziva kod diferencijalne pulsne voltametrije.

2.2.3. Ciklička voltametrij

Ciklička voltametrij (CV eng. *Cyclic Voltammetry*) je elektroanalitička metoda koja se koristi za određivanje redoks potencijala, mehanizma redoks reakcija, određivanje broja izmijenjenih elektrona, ispitivanje adsorpcijskih procesa i ispitivanje kinetike. Često se koristi kao metoda za prvu analizu elektrokemijskih reakcija koje se odvijaju na površini elektrode što otkriva mehanizam reakcija (radi li se o reverzibilnom, ireverzibilnom ili kvazireverzibilnom procesu). Granica detekcije cikličke voltametrije je od 10^{-5} mol dm⁻³ do 10^{-6} mol dm⁻³ u određenim uvjetima. Signal pobude kod cikličke voltametrije je linearno promjenjivi potencijal, odnosno potencijal radne elektrode se linearno mijenja s vremenom te pri određenom potencijalu dolazi do procesa oksidacije. Nakon što postigne odgovarajući potencijal mijenja se smjer promjene potencijala, odnosno odvija se proces redukcije oksidiranog oblika elektroaktivne tvari. Signal odziva je struja te se mjeri kao funkcija određenog potencijala. Kod cikličke voltametrije signal odziva donosi karakterističan oblik voltamograma s katodnim i anodnim strujnim vrhom. Osnovni princip koji se promatra je potencijal radne elektrode koji se mijenja linearno s vremenom od početnog potencijala ($E_{\text{poč}}$) do konačnog potencijala (E_{kon}) i natrag (Slika 8.A). Rezultat linearne pobude je elektrokemijska reakcija na elektrodi koja se grafički prikazuje kao odnos struje i potencijala, odnosno ciklički voltamogram (Slika 8.B). Brzina promjene potencijala se može mijenjati, pa se mogu ispitati brze i spore elektrodne reakcije. Visina strujnog odziva ovisi o broju izmijenjenih elektrona po čestici, koncentraciji elektroreduktanta u otopini, faktorima koji određuju brzinu difuzije i površini radne elektrode. Proces koji se odvijaju na elektrodi kod cikličke voltametrije mogu se podijeliti s obzirom na brzinu prijenosa naboja na ireverzibilan proces, reverzibilan proces i kvazireverzibilan proces [28, 30].



Slika 8. A) Prikaz signal pobude i B) signal odziva u cikličkoj voltametriji [33].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.KEMIKALIJE I PRIPRAVA OTOPINA

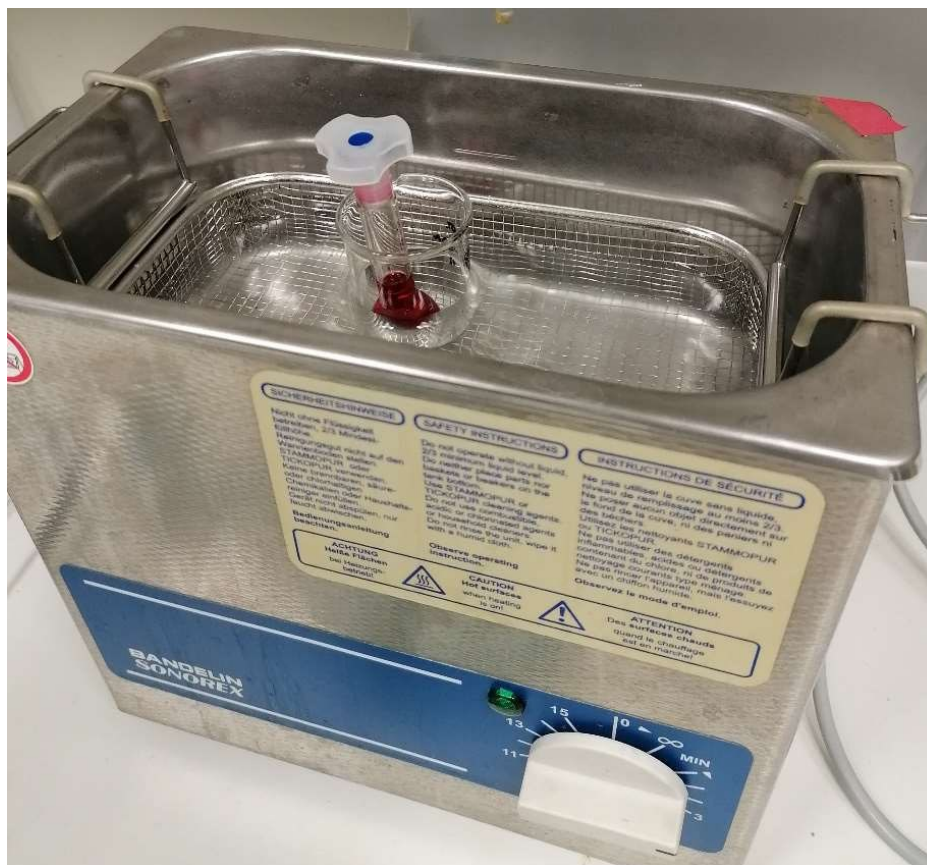
U eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije i uzorci:

1. Vitamin B12
2. Destilirana voda
3. Ultra čista voda ($\sigma \leq 0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$)
4. Etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
5. Metanol, CH_3OH
6. Dimetil-formamid (DMF)
7. Dimetil-sulfoksid (DMSO)
8. KCl ($c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$)
9. HCl ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$)
10. NaOH ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$)
11. Kalij hidrogen ftalat, $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$)
12. Kalij dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$)
13. Natrij hidrogen karbonat, NaHCO_3 ($c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$)
14. Tris baza (tris(hidroksimetil)-metilamine) ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$)
15. Kalijev nitrat, KNO_3 ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$)
16. Sumporna kiselina, H_2SO_4
17. Dušična kiselina, HNO_3
18. Realni uzorak: Kapsule B-kompleksa

Puferi određene pH vrijednosti koji su korišteni u ovom radu pripremljeni su na slijedeći način. Otopine pufera pripremljene su u odmjernim tikvicama od 100 ml te su sve otopine priređivane s ultra čistom vodom čija je provodljivost manja ili jednaka $0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$. Za pripremu pufera pH = 2 u odmjernu tikvicu od 100 ml dodano je 25 ml otopine KCl ($c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) i 6,5 ml otopine HCl ($c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) i ostatak do 100 ml nadopunjen vodom. Za pripremu pufera pH = 3 u odmjernu tikvicu od 100 ml dodano je 50 ml otopine kalij hidrogen ftalata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i 22,3 ml otopine HCl ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i ostatak do 100 ml nadopunjen vodom. Za pripremu pufera pH = 4 u odmjernu tikvicu od 100 ml dodano je 50 ml

otopine kalij hidrogen ftalata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i 0,1 ml otopine HCl ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i ostatak do 100 ml nadopunjen vodom. Za pripremu pufera pH = 5 u odmjernu tikvicu od 100 ml dodano je 50 ml otopine kalij hidrogen ftalata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i 22,6 ml otopine NaOH ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i ostatak do 100 ml nadopunjen vodom. Za pripremu pufera pH = 6 u odmjernu tikvicu od 100 ml dodano je 50 ml otopine kalij dihidrogen fosfata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i 5,6 ml otopine NaOH ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i ostatak do 100 ml nadopunjen vodom. Za pripremu pufera pH = 7 u odmjernu tikvicu od 100 ml dodano je 50 ml otopine kalij dihidrogen fosfata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i 29,1 ml otopine NaOH ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i ostatak do 100 ml nadopunjen vodom. Za pripremu pufera pH = 8 u odmjernu tikvicu od 100 ml dodano je 50 ml otopine kalij dihidrogen fosfata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i 46,1 ml otopine NaOH ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i ostatak do 100 ml nadopunjen vodom. Za pripremu pufera pH = 9 u odmjernu tikvicu od 100 ml dodano je 50 ml otopine tris baza ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i 5,7 ml otopine HCl ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i ostatak do 100 ml nadopunjen vodom. Za pripremu pufera pH = 10 u odmjernu tikvicu od 100 ml dodano je 50 ml otopine natrij hidrogen karbonata ($c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) i 10,7 ml otopine NaOH ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i ostatak do 100 ml nadopunjen vodom. Nakon pripreme otopina pufera određene su njihove točne pH vrijednosti pomoću pH metra.

Standardna (stock) otopina vitamina B12 korištena za elektrokemijska mjerenja, koncentracije $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pripravljena je otapanjem 0,01355 g vitamina B12 molarne mase $1355,37 \text{ g mol}^{-1}$ u odmjernoj tikvici od 10 ml s vodom. Da bi se u potpunosti otopio vitamin B12 u vodi, otopina je stavljena na 5 – 10 min u ultrazvučnu kupelj (Slika 9.). Otopina vitamina B12 željene koncentracije ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) pripravljena je razrjeđivanjem standardne otopine vitamina B12 otopinom pufera odgovarajuće pH vrijednosti neposredno prije mjerenja.

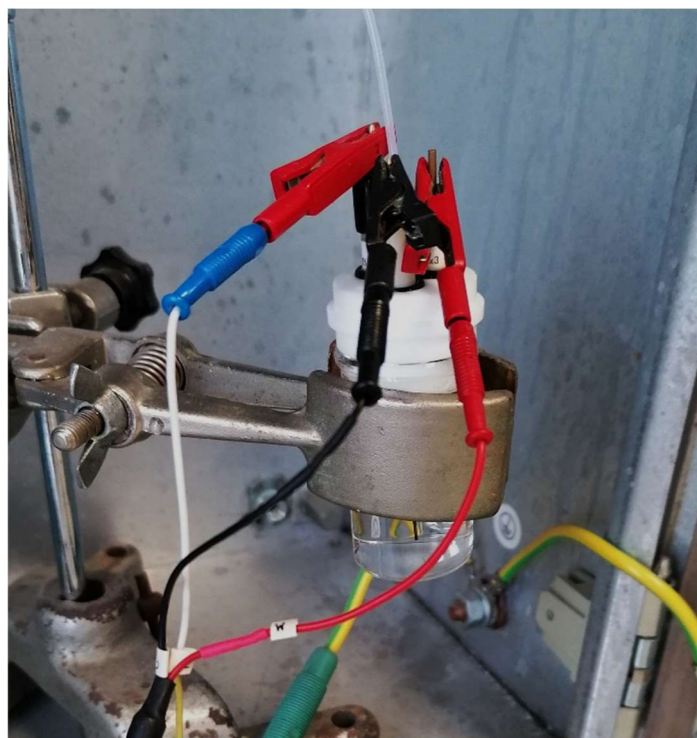


Slika 9. Standardna (stock) otopina vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u ultrazvučnoj kupelji.

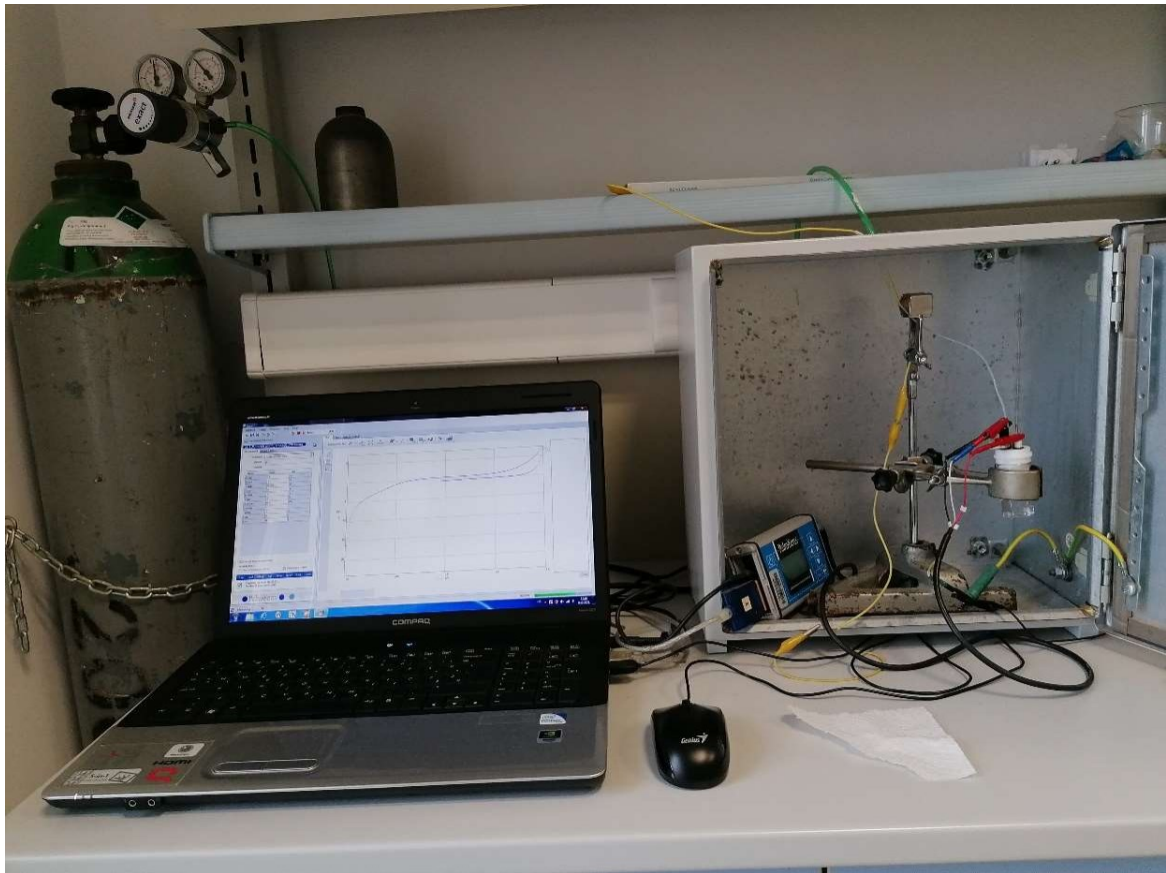
3.2.ELEKTROKEMIJSKA ĆELIJA

Sva elektrokemijska mjerenja izvedena su pri sobnoj temperaturi ($T = \pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$) u troelektrodnoj voltometrijskoj ćeliji (Slika 10.). Voltometrijska ćelija je spojena na PalmSens potenciostat/galvanostat koji je smješten u Faradayevom kavezu i spojen je na računalo. Dobiveni podaci obrađeni su pomoću PSTrace računalnog programa (Slika 11.). Za elektrokemijska mjerenja korištena je radna elektroda od staklastog ugljika (eng. *glassy carbon*) na kojoj su se odvijale redoks reakcije (Slika 12. A). Kao referentna elektroda korištena je Ag/AgCl elektroda za mjerenje signala odziva (Slika 12. B), a kao protuelektroda korištena je platinska žica pomoću koje se ostvario tok električne struje kroz ćeliju (Slika 12. C) Prije svakog mjerenja polirana je radna elektroda sa suspenzijom $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ i sustav je propuhivan argonom visoke čistoće Ar 5 ($\Phi_{\text{Ar}} = 99,999 \%$). Ukupni volumen ispitivane otopine u ćeliji iznosio je 15 ml. Kao blank otopine korištene su otopine priređenih pufra u koje je dodan

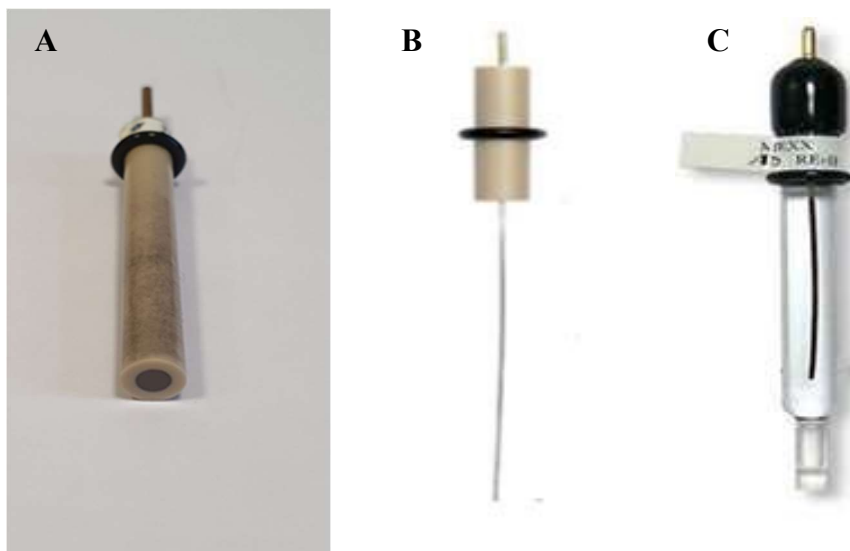
inertni elektrolit. Blank otopina u ćeliji priređena je od 13,5 ml pufera određene pH vrijednosti i 1,5 ml otopine KNO_3 ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Stock otopina vitamina B12 priređivana je svaki dan. Otopina ispitivanog analita u voltametrijskoj ćeliji priređena je dodatkom 1,5 ml otopine vitamina B12 (pripremljene stock otopine vitamina B12, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), 1,5 ml otopine KNO_3 ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i 12 ml pufera odgovarajuće pH vrijednosti.



Slika 10. Troelektrodna voltametrijska ćelija.



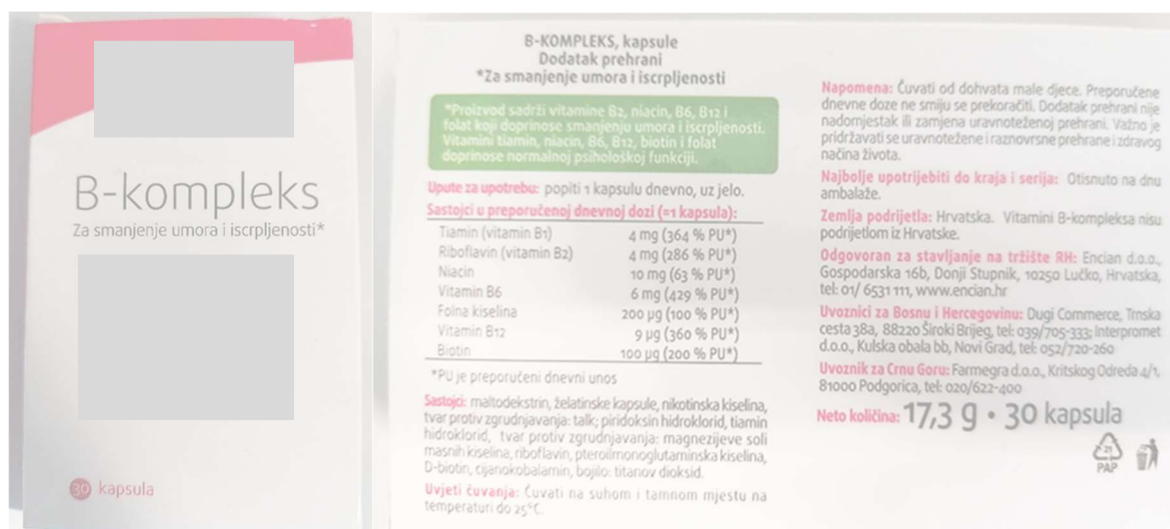
Slika 11. Aparatura za izvođenje elektrokemijskih mjerenja.



Slika 12. A) Elektroda od staklastog ugljika, B) Platinska žica, C) Ag/AgCl elektroda.

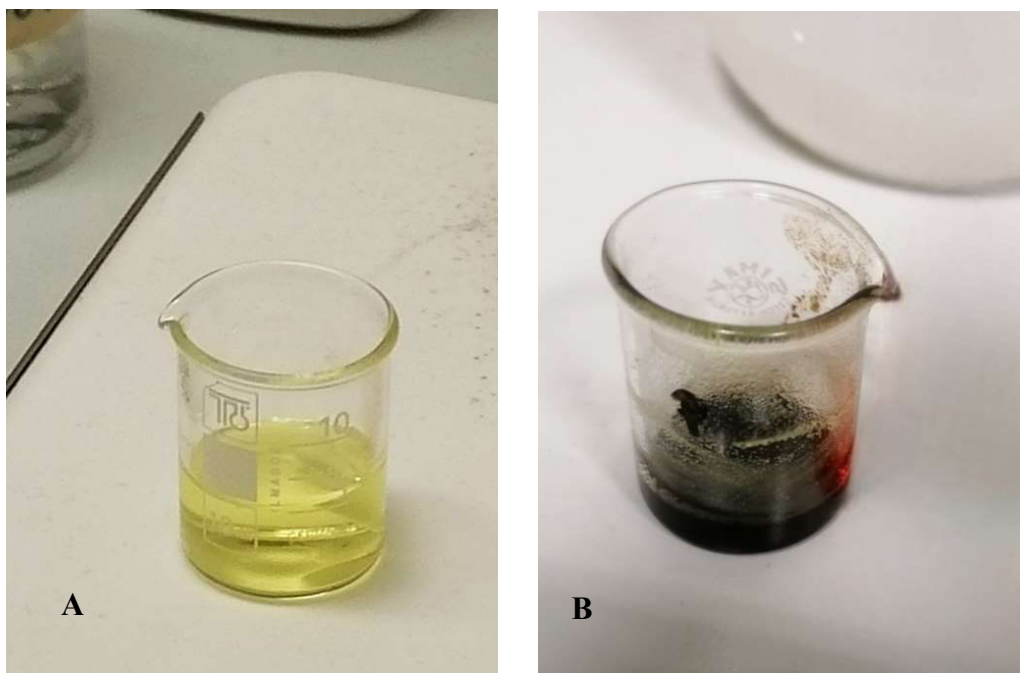
3.3.PRIPREVA REALNOG UZORKA

Analiziran je realni uzorak vitamina B12 u obliku kapsula B-kompleksa (Slika 13.). Uzorak je pripremljen otapanjem praha jedne kapsule u 5 ml HNO₃ i 0,5 ml H₂SO₄ u čaši od 10 ml. Tako pripremljena otopina je zagrijavana na električnom grijaču do smanjenja ukupnog volumena na približno 0,5 ml [34].



Slika 13. Ispitivani realni uzorak B-kompleksa.

Otopina praha kapsule prije zagrijavanja bila je žute boje (Slika 14. A), a nakon zagrijavanja i smanjenja volumena crne boje (Slika 14. B). Provedena su četiri mjerenja realnog uzorka: 1. mjerenje u blank otopini (pufer pH = 4), 2. mjerenje u otopini realnog uzorka (u ćeliju je dodano 100 µL realnog uzorka, 13,40 mL pufera pH = 4 i 1,5 ml KNO₃) te 3. mjerenje u otopini realnog uzorka uz dodatak stock otopine vitamina B12 (u ćeliju je dodano 100 µL realnog uzorka, 13,4 mL pufera pH = 4 i 100 µL stock otopine vitamina B12, $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³). Kod 4. mjerenja u otopinu priređenu za 3. mjerenje dodano je još 100 µL stock otopine vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³).



Slika 14. A) Pripremljeni realni uzorak prije zagrijavanja, **B)** realni uzorak nakon zagrijavanja.

3.4. METODE

3.4.1. Ispitivanje topljivosti vitamina B12

Topljivost vitamina B12 ispitana je u etanolu, metanolu, dimetil-formamidu (DMF), dimetil-sulfoksidu (DMSO) i vodi (Slika 15.). Ispitivanja su pokazala da se ispitivani spoj vrlo dobro otopio u svim korištenim otapalima, a kao otapalo za daljnje ispitivanje korištena je voda.



Slika 15. Ispitivanje topljivosti vitamina B12 u različitim otapalima.

3.4.2. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija korištena je za proučavanje elektrokemijskih svojstava vitamina B12 i njegovog oksidacijskog mehanizma. Nadalje, proučavan je i utjecaj brzine promjene potencijala na oksidacijske i redukcijske strujne vrhove vitamina B12. Ciklički voltamogrami snimljeni su u otopinama vitamina B12 u granicama potencijala od $-1,0$ V do $1,0$ V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu u vodenom mediju. Brzina polarizacije elektrode u cikličkoj voltametriji kretala se od 50 mV/s do 300 mV/s. Mjerenja su provedena pomoću PalmSens potenciostata/galvanostata spojenog na računalo, a obrada podataka provedena je korištenjem PSTrace računalnog programa.

3.4.3. Diferencijalna pulsna voltametrija

Diferencijalna pulsna voltametrija korištena je za proučavanje oksidacijskih svojstava i adsorpcije vitamina B12 na površini elektrode od staklastog ugljika. Također, realni uzorak vitamina B12 analiziran je korištenjem diferencijalno pulsne voltametrije. DPV metoda omogućuje praćenje utjecaja pH na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha te je utvrđeno da oksidacija istraživanog vitamina B12 ovisi o pH. Snimljeni su diferencijalni pulsni

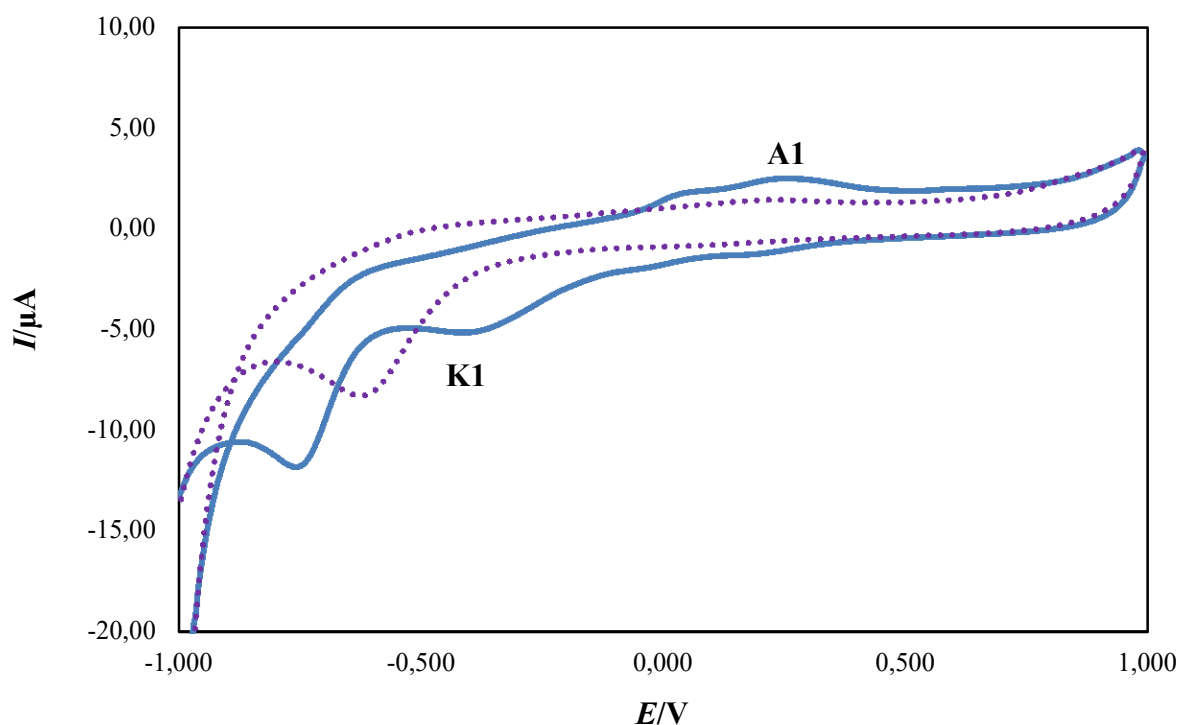
voltamogrami u otopinama vitamina B12 u granicama potencijala od $-1,0$ V do $1,0$ V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu u vodenom mediju uz brzinu polarizacije elektrode od 5 mV/s, visinu pulsa 25 mV, širinu pulsa 70 ms i *scan increment* 5 mV. Mjerenja su provedena uz pomoć PalmSens potenciostata/galvanostata spojenog na računalo, a obrada podataka provedena je korištenjem PSTrace računalnog programa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

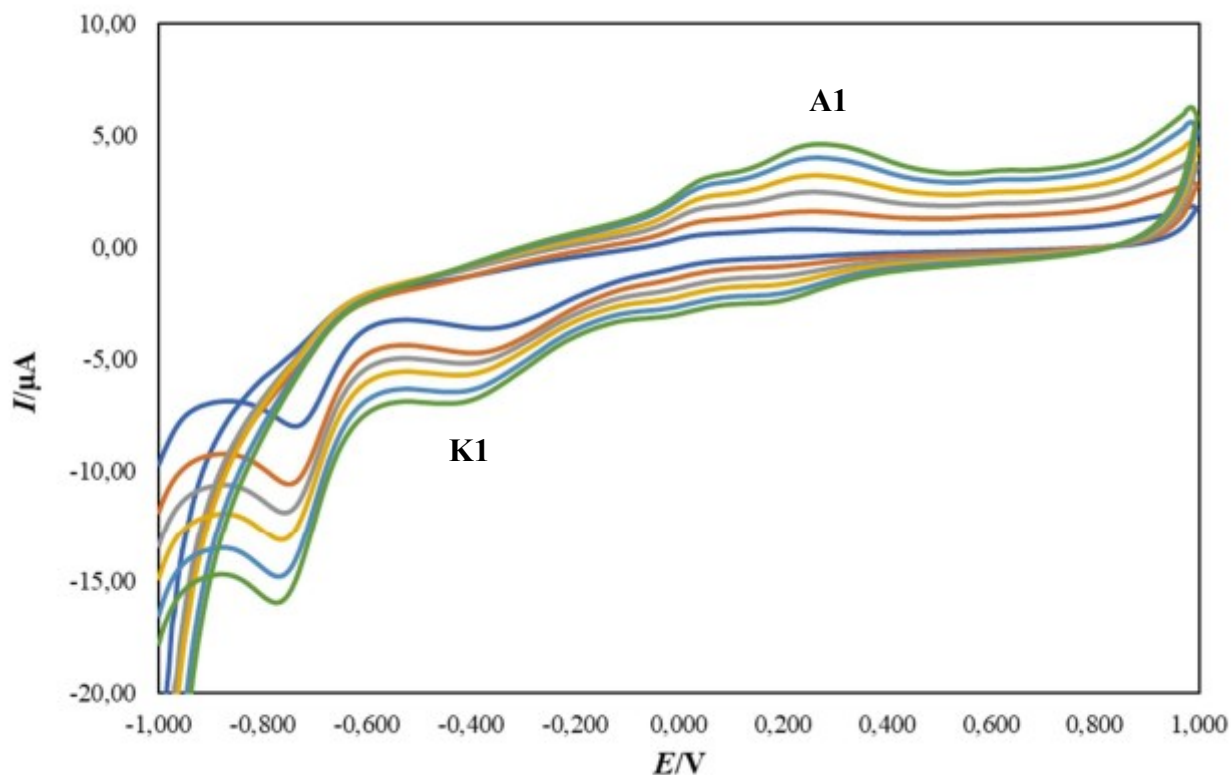
4.1.1. Utjecaj brzine polarizacije

Elektrokemijska svojstva vitamina B12 prvo su ispitivana cikličkom voltametrijom u rasponu potencijala od $-1,0$ V do $1,0$ V. Ciklički voltamogram blank otopine (pufer pH = 4) i otopine vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³) koristeći elektrodu od staklastog ugljika, pri brzini polarizacije elektrode, $v = 150$ mV/s prikazani su na slici 16. Cikličkom voltametrijom detektiran je jedan oksidacijski strujni vrh (A1) pri potencijalu $E_{p,a,1} = 0,250$ V koji se odnosi na oksidaciju Co^{2+} u Co^{3+} . Detektiran je i jedan redukcijski strujni vrh (K1) pri potencijalu, $E_{p,k,1} = -0,365$ V koji se odnosi na redukciju Co^{3+} u Co^{2+} [35]. Razlika potencijala oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha, $\Delta E = 0,615$ V što ukazuje na ireverzibilni proces.



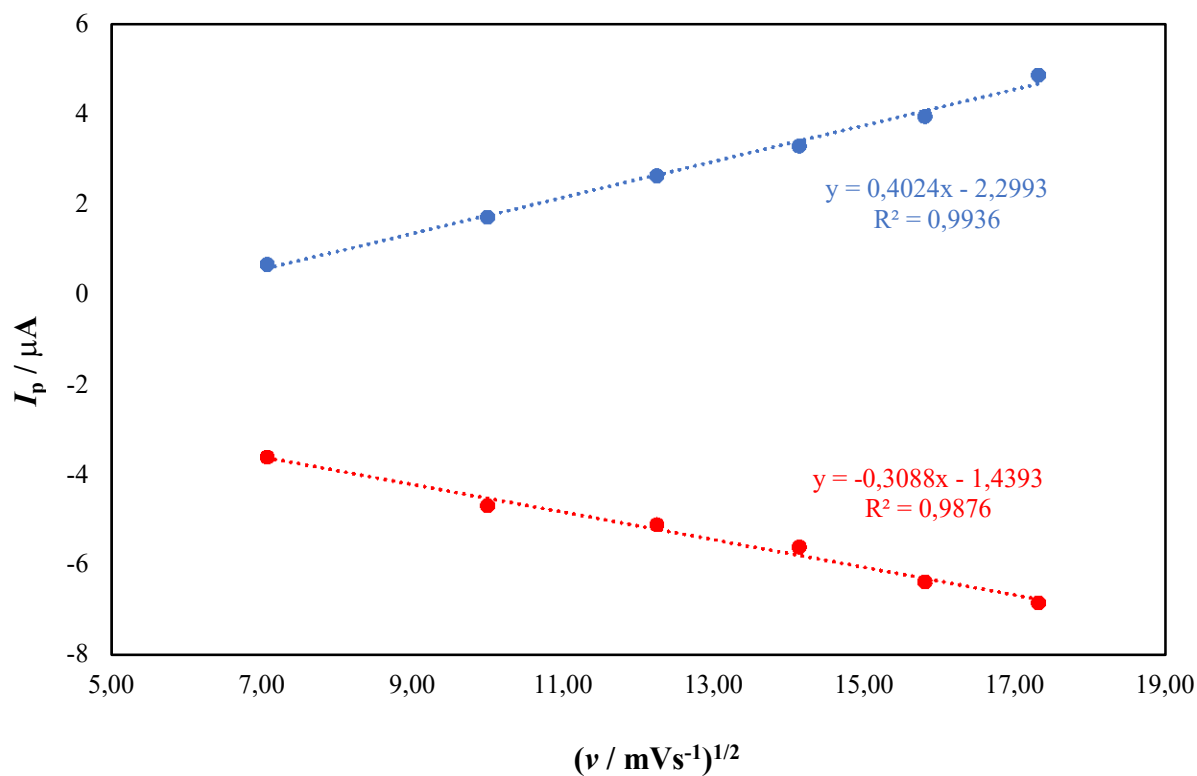
Slika 16. Ciklički voltamogrami blank otopine (pufer pH = 4) (...) i otopine vitamina B12 (—) ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$), $v = 150 \text{ mV/s}$.

Na slici 17. prikazani su ciklički voltamogrami otopine vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 50, 100, 150, 200, 250$ i 300 mV/s) u puferu pH = 4. Ustanovljeno je da s povećanjem brzine polarizacije elektrode raste struja oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha. Potencijal oksidacijskog strujnog vrha (A1) se pomiče prema višim potencijalima s povećanjem brzine polarizacije elektrode (pozitivira se) dok se potencijal redukcijskog strujnog vrha (K1) pomiče prema nižim potencijalima (negativira se).



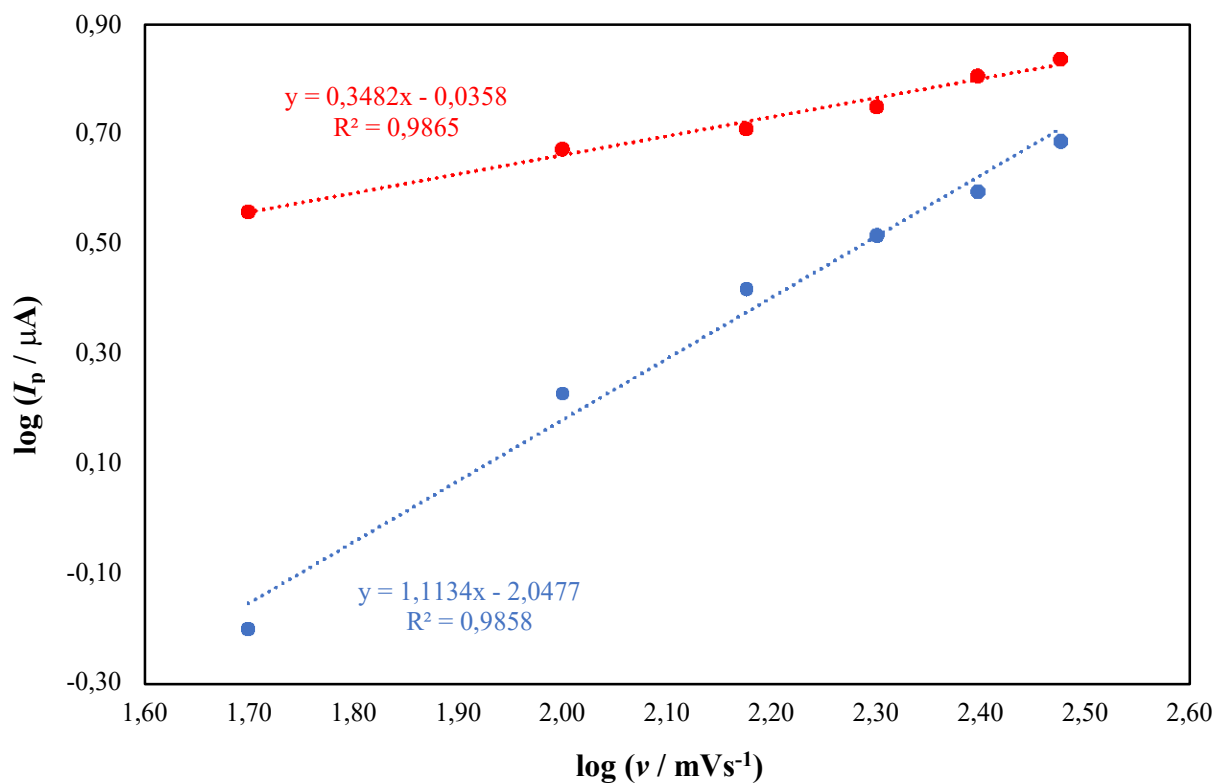
Slika 17. Ciklički voltamogrami otopine vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 50 \text{ mV/s}$ (—), 100 mV/s (—), 150 mV/s (—), 200 mV/s (—), 250 mV/s (—), 300 mV/s (—)) u puferu $\text{pH} = 4$.

Grafički prikaz ovisnosti struje redukcijskog ($I_{p,k}$) i oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) o drugom korijenu brzine polarizacije elektrode ($v^{1/2}$) pokazuje linearnu ovisnost za anodni i katodni strujni vrh što može ukazivati na difuzijski kontroliran oksido-redukcijski proces (Slika 18.).



Slika 18. Struja anodnog (●) i katodnog (●) strujnog vrha, I_p kao funkcija drugog korijena brzine polarizacije elektrode, $v^{1/2}$.

Grafički prikaz ovisnosti logaritma struje oksidacijskog ($I_{p,a}$) i redukcijskog ($I_{p,k}$) strujnog vrha o logaritmu brzine polarizacije elektrode ($\log v$) pokazuje linearnu ovisnost za anodni i katodni strujni vrh (Slika 19.). Nagib pravca je oko 1 za anodni strujni vrh što ukazuje na adsorpcijski kontroliran proces oksidacije Co^{2+} u Co^{3+} dok je nagib pravca oko 0,5 za katodni strujni vrh što potvrđuje da je proces redukcije Co^{3+} u Co^{2+} u vitaminu B12 pod difuzijskom kontrolom.

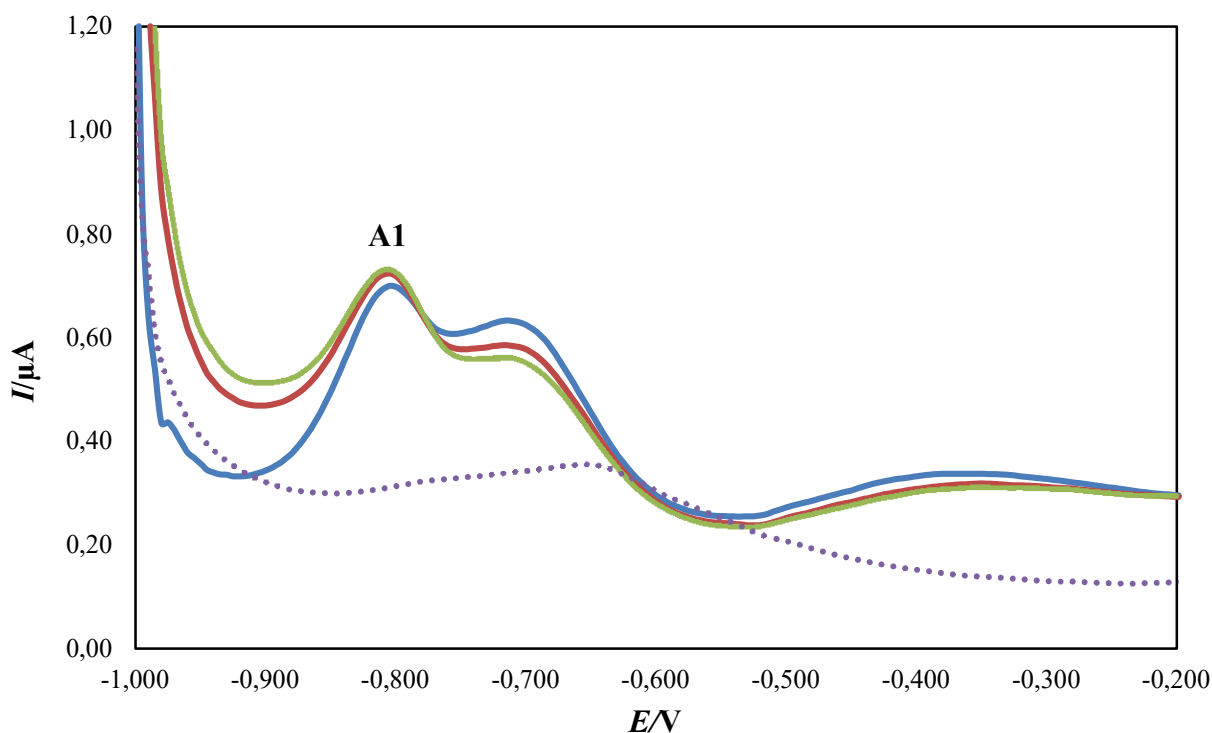


Slika 19. Logaritam struje anodnog (●) i katodnog (●) strujnog vrha, I_p kao funkcija logaritma brzine polarizacije elektrode, $\log v$.

4.2.DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

4.2.1. Ispitivanje adsorpcije

Diferencijalni pulsni voltamogrami vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu $\text{pH} = 4$ koristeći elektrodu od staklastog ugljika prikazani su na slici 20. Na slici je prikazan oksidacijski strujni vrh (A1), pri potencijalu, $E_{p,a,1} = -0,825 \text{ V}$ koji se odnosi na oksidaciju Co^{2+} u Co^{3+} . Utvrđeno je da sukcesivnim snimanjem voltamograma opada visina oksidacijskog strujna vrha vitamina B12. Navedeno ukazuje na adsorpciju oksidacijskog produkta vitamina B12 na površinu elektrode od staklastog ugljika.



Slika 20. Diferencijalni pulsni voltamogrami blank otopine (pufer pH=4) (...) i uzastopno snimljeni voltamogrami vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4 (1. scan (—), 2. scan (—), 3. scan (—)).

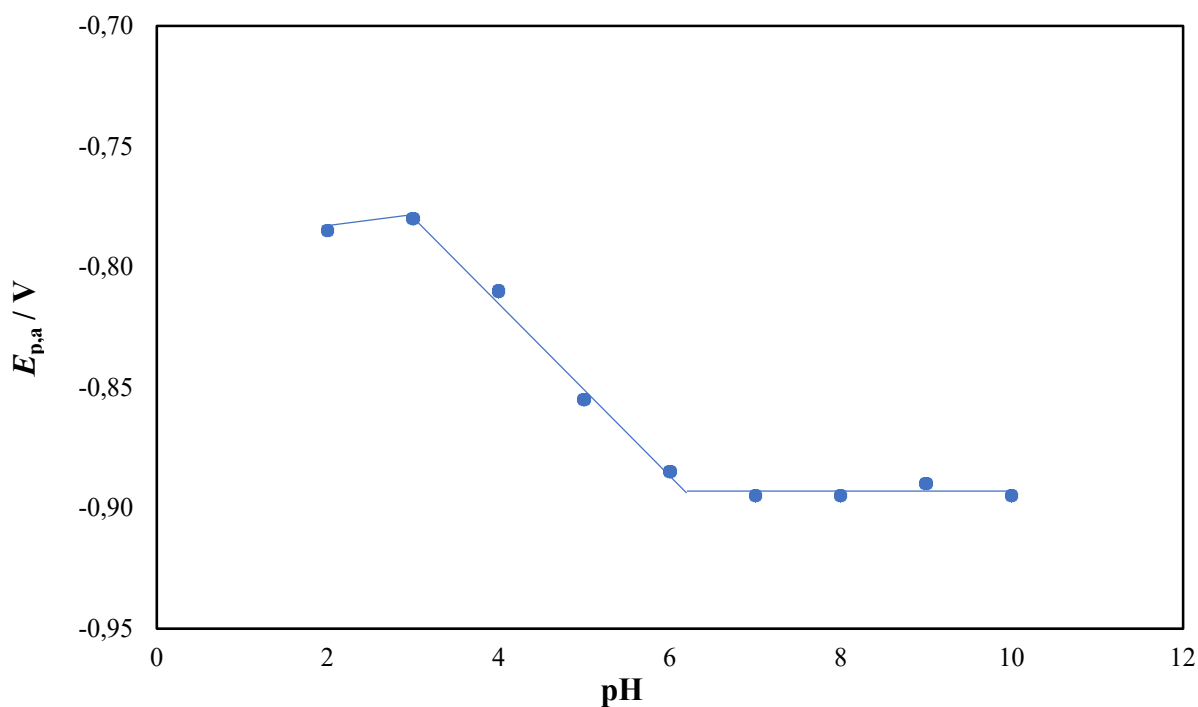
4.2.2. Ispitivanje utjecaja pH

Diferencijalni pulsni voltamogrami vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika kao funkcija pH vrijednosti ispitivanih otopina vitamina B12 u puferima pH područja od pH = 2 do pH = 10 te su dobivene vrijednosti prikazane u tablici 2. Iz tablice je vidljivo da je anodni strujni vrh najviši pri pH = 2, a zatim daljnjim povećavanjem pH vrijednosti opada vrijednost anodnog strujnog vrha. To ukazuje da je proces oksidacije vitamina B12 najizraženiji oko pH = 2.

Tablica 2. Prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) i potencijala oksidacijskog strujnog vrha ($E_{p,a}$) o pH vrijednosti ispitivanih otopina vitamina B12 u puferima pH područja od pH = 2 do pH = 10.

pH	$I_{p,a}$ / mA	E / V
2	1,92035	-0,785
3	0,878967	-0,78
4	0,74334	-0,81
5	0,658017	-0,855
6	0,728317	-0,885
7	0,828747	-0,895
8	1,10615	-0,895
9	0,764997	-0,89
10	1,16619	-0,895

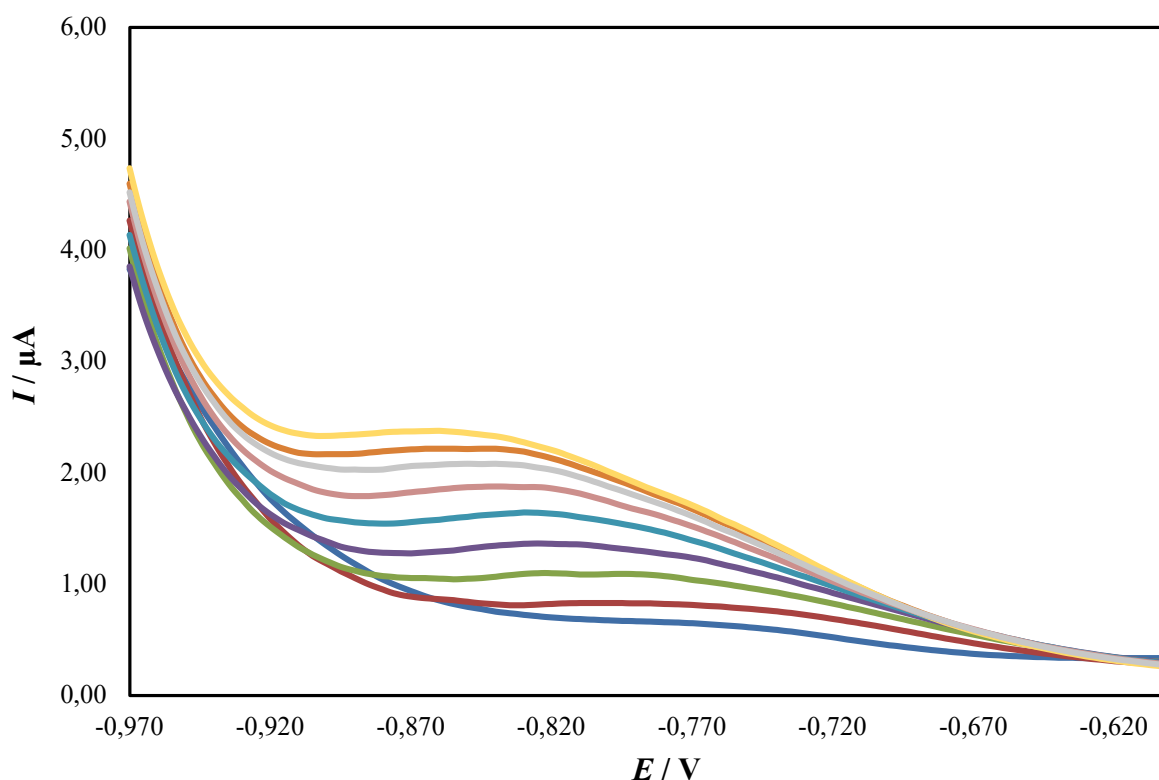
Ovisnost potencijala anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti ispitivanih otopina vitamina B12 prikazana je na slici 21. Iz slike je vidljivo da se potencijali oksidacijskog strujnog vrha pomiču prema negativnijim potencijalima s povećanjem pH vrijednosti.



Slika 21. Prikaz ovisnosti potencijala anodnog strujnog vrha o pH vrijednosti otopine vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$).

4.2.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije

Utjecaj koncentracije na visinu oksidacijskog strujnog vrha vitamina B12 ispitivan je diferencijalnom pulsnom voltametrijom u puferu $\text{pH} = 2$. Na slici 22. prikazani su diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni u otopinama vitamina B12 različitih koncentracija na elektrodi od staklastog ugljika. Na diferencijalnim pulsanim voltamogramima može se uočiti da najniža koncentracija vitamina B12 koja se može detektirati (granica detekcije) iznosi $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.



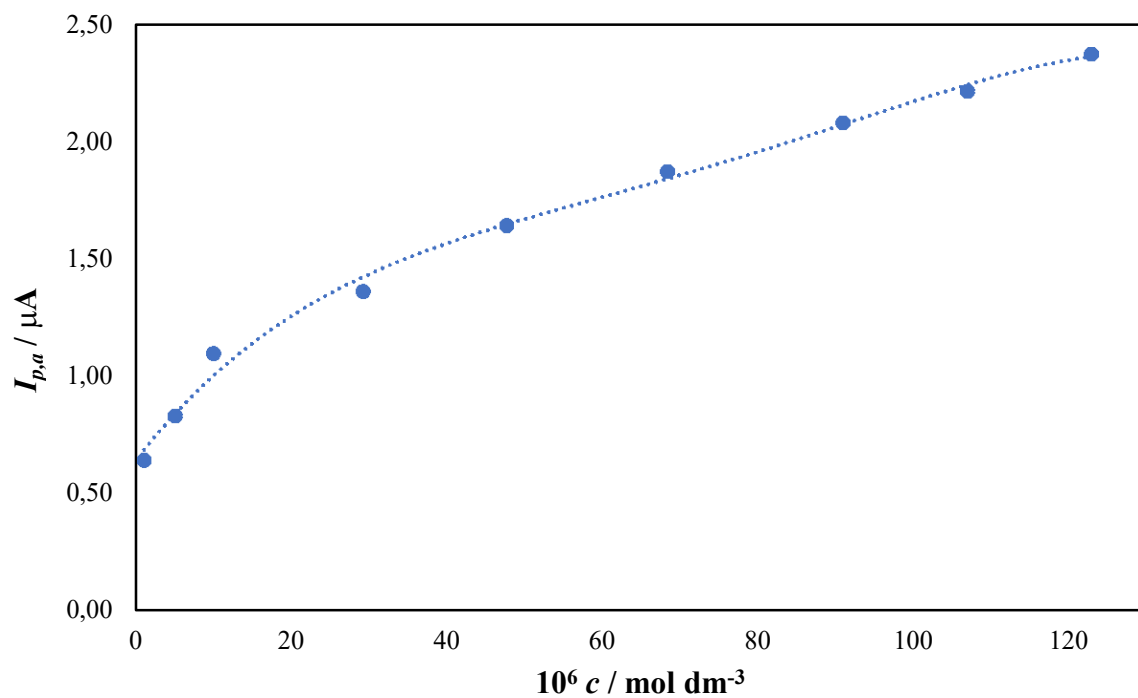
Slika 22. Diferencijalni pulsni voltamogrami vitamina B12 snimljeni u otopinama različitih koncentracija ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ (—), $4,98 \cdot 10^{-6}$ (—), $9,91 \cdot 10^{-6}$ (—), $2,92 \cdot 10^{-5}$ (—), $4,77 \cdot 10^{-5}$ (—), $6,84 \cdot 10^{-5}$ (—), $9,10 \cdot 10^{-5}$ (—), $1,07 \cdot 10^{-4}$ (—), $1,23 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} (—)) na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 2.

U tablici 3. prikazane su struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) vitamina B12 kao funkcije koncentracije. Iz podataka u tablici je vidljivo da s povećanjem koncentracije raste i struja oksidacijskog strujnog vrha. Kod većih koncentracija dolazi do odstupanja od linearnosti (Slika 23.), zbog prisustva intenzivnijih interakcija s molekulama koje su adsorbirane na površini radne elektrode te zbog difuzijske struje.

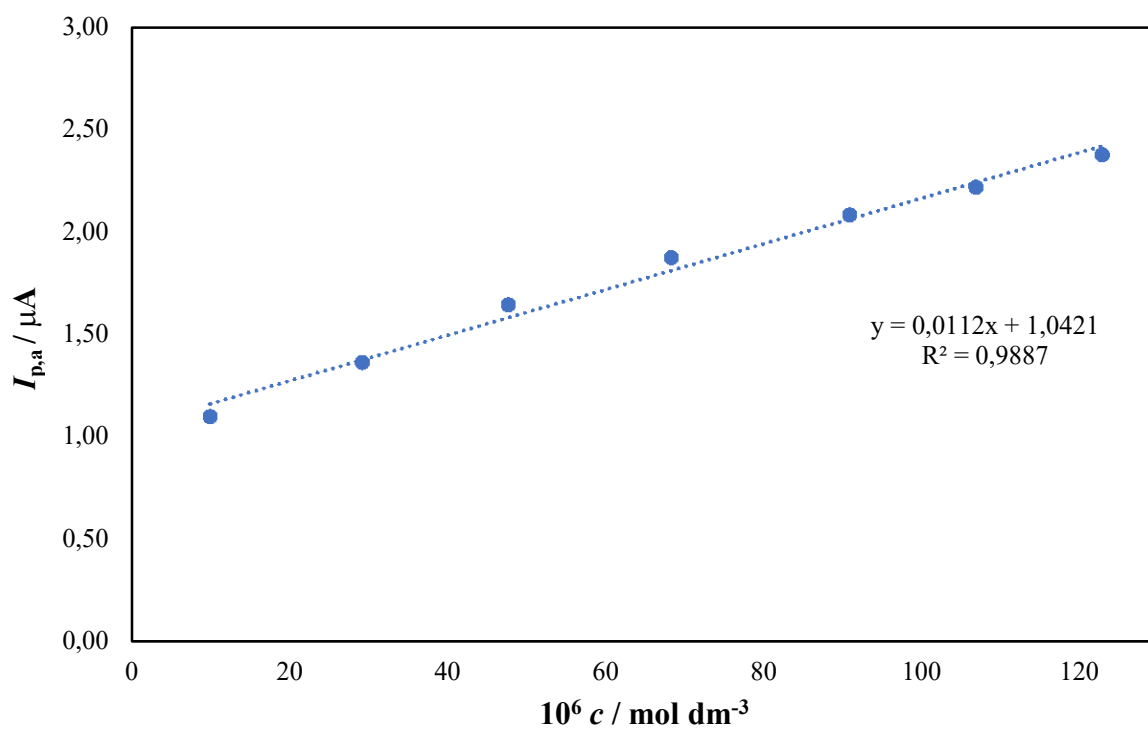
Tablica 3. Prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) kao funkcije koncentracije vitamina B12.

$10^6 c / \text{mol dm}^{-3}$	$I_{p,a} / \mu\text{A}$
1,00	0,632
4,98	0,822
9,91	1,090
29,2	1,356
47,7	1,639
68,4	1,871
91,0	2,080
107	2,216
123	2,376

Utvrđeno je da struja oksidacijskog strujnog vrha raste s povećanjem koncentracije vitamina B12. Uočava se linearni trend tj. linearna ovisnost oksidacijske struje o koncentraciji vitamina B12 može se uočiti u rasponu koncentracija $1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,23 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (Slika 24.).



Slika 23. Grafički prikaz struje oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) kao funkcije koncentracije vitamina B12.

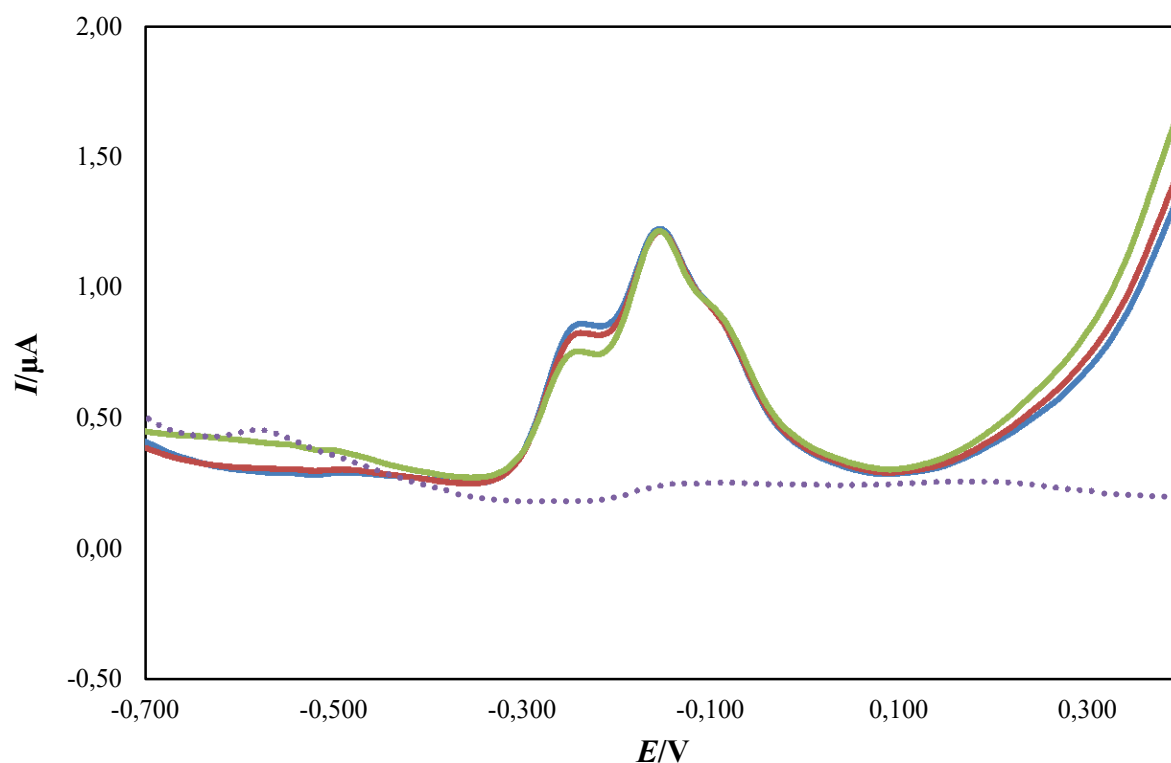


Slika 24. Prikaz linearne ovisnosti struje anodnog strujnog vrha ($I_{p,a}$) vitamina B12 o koncentraciji.

4.3. ANALIZA REALNOG UZORKA

4.3.1. Diferencijalna pulsna voltametrija

Vitamin B12 kvalitativno je detektiran u realnom uzorku kapsula B-kompleksa diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Na slici 25. prikazan je diferencijalni pulsni voltammogram ispitivanog realnog uzorka snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u puferu pH = 4 (za pripremu uzorka koristili smo prethodno opisanu metodu u odlomku Priprava realnog uzorka [34]). Na diferencijalnom pulsnom voltammogramu ispitivanog uzorka uočen je jedan oksidacijski strujni vrh, pri potencijalu, $E_{p,a} = -0,15$ V koji odgovara oksidaciji kobalta u vitaminu B12 (Co^{2+} u Co^{3+}) u ispitivanom uzorku. Oksidacija vitamina B12 u ispitivanom uzorku dokazana je dodatkom standardne otopine vitamina B12, koncentracije $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} (dva puta po 100 μL).



Slika 25. Diferencijalni pulsni voltammogrami blank otopine (pufer pH = 4) (...), otopine realnog uzorka u puferu pH = 4 (—), otopine uzorka u puferu pH=4 s dodatkom prvih 100 μL standardne otopine vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) (—) i uzorak u puferu pH = 4 s dodatkom drugih 100 μL standardne otopine vitamina B12 ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) (—) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu istraživana su elektrokemijska svojstva vitamina B12 u pH području od $\text{pH} = 2$ do $\text{pH} = 10$. U radu su korištene dvije metode; ciklička voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija. Ciklička voltometrija upotrebljavana je za proučavanje oksidacijskog mehanizma vitamina B12, dok je diferencijalna pulsna voltometrija upotrebljavana za proučavanje adsorpcije, utjecaja pH i koncentracije vitamina B12 na struju i potencijal oksidacijskog strujnog vrha te za detekciju vitamina B12 u realnom uzorku.

Standardna otopina vitamina B12 prvo je ispitivana cikličkom voltametrijom pri čemu su detektirani jedan oksidacijski strujni vrh te jedan reduksijski strujni vrh. Navedeni strujni vrhovi se odnose na oksidaciju Co^{2+} u Co^{3+} odnosno na redukciju Co^{3+} u Co^{2+} . Ispitivanjem utjecaja brzine polarizacije utvrđeno je da struja i potencijal oksidacijskog (anodnog) i reduksijskog (katodnog) strujnog vrha rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode te da je oksidacija Co^{2+} u Co^{3+} adsorpcijski kontroliran proces dok je redukcija Co^{3+} u Co^{2+} difuzijski kontroliran proces jer je logaritam struje anodnog i katodnog strujnog vrha linearna funkcija logaritma brzine polarizacije elektrode (nagib pravca je oko 1 za anodni i oko 0,5 za katodni strujni vrh).

Diferencijalnom pulsnom voltametrijom ispitivana je adsorpcija te je utvrđeno da sukcesivnim snimanjem pri $\text{pH} = 4$ voltamogram prikazuje opadanje visine oksidacijskog strujnog vrha vitamina B12 što ukazuje na adsorpciju oksidacijskog produkta na površinu radne elektrode. Međutim, adsorpcija se događa samo pri $\text{pH} = 4$. Ispitivanjem utjecaja pH diferencijalni pulsni voltamogrami pokazuju da oksidacija ispitivanog vitamina B12 ovisi o pH vrijednosti. Uočeno je da je optimalna pH vrijednost za oksidaciju vitamina B12 za elektrodu od staklastog ugljika bila pri $\text{pH} = 2$, jer je pri $\text{pH} = 2$ detektiran najviši oksidacijski strujni vrh ispitivanog vitamina B12 dok se visina oksidacijskog strujnog vrha smanjivala pri višim pH vrijednostima. Ispitivanjem utjecaja koncentracije u otopinama vitamina B12 različitih koncentracija diferencijalni pulsni voltamogrami su pokazali da najniža koncentracija koja se može detektirati (granica detekcije) iznosi $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Također, utvrđeno je da struja oksidacijskog strujnog vrha raste s povećanjem koncentracije vitamina B12 te je uočena linearna ovisnost u rasponu koncentracija od $1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,23 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Diferencijalnom pulsnom voltametrijom kvalitativno je detektiran vitamin B12 u realnom uzorku kapsule B-kompleksa koristeći elektrodu od staklastog ugljika. Realni uzorka

ima kompleksniji sastav od standardne otopine zbog čega je oksidacija kobalta u vitamin B12 potvrđena dodatkom standardne otopine vitamina B12 u realni uzorak.

6. LITERATURA

1. D. A. Bender, Nutritional Biochemistry of the Vitamins, Cambridge 2 (2003), 298-321.
2. H. Filik, A. A. Avan, S. Aydar, Electrochemical Determination of Vitamin B-12 in Food Samples by Poly(2,2'-(1,4-phenylenedivinylene) Bis-8 hydroxyquinoline)/ Multi-Walled Carbon Nanotube-Modified Glassy Carbon Electrode, Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Istanbul University, (2016).
3. G. R. Minot, L. P. Murphy, Treatment of pernicious anaemia by special diet. Journal of the American Medical Association, 87, (1926), 470–476.
4. G. H. Whipple, F. S. Robscheit-Robbins, Favourable influence of liver, heart and skeletal muscle in diet on blood regeneration in anemia. American Journal of Physiology, 72, (1925.), 408–418.
5. E. L. Rickes, N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood, K. Folkers, Crystalline Vitamin B12. Science, 107(2781), (1948.) 396–397.
6. D. C. Hodgkin, J. Kamper, M. Mackay, J. Pickworth, K. N. Trueblood, J.G. White, Structure of vitamin B12. Nature, 178(4524), (1956.), 64–66.
7. A. D. Smith, M. J. Warren, H. Refsum, Vitamin B₁₂, Advances in Food and Nutrition Research, 83, (2018), 215-279.
8. J.M.Berg, J.L.Tymoczko, L.Stryer, Biokemija, 1.izdanje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, (2013).
9. J.M.Berg, J.L.Tymoczko, L.Stryer, Biochemistry, W.H. Freeman, 5 (2002).
10. R. Banerjee, S. W. Ragsdale, The many faces of vitamin B12: Catalysis by cobalamin-dependent enzymes, Annual Review of Biochemistry, 72 (2003), 209–247.
11. <https://www.vasezdravlje.com/hrana-i-zdravlje/visestruka-uloga-vitamina-b12> (11.07.2023.)
12. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2011_04_46_1066.html (11.07.2023.)
13. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB12-HealthProfessional/> (12.07.2023.)
14. <https://www.health.harvard.edu/staying-healthy/the-a-list-of-b12-foods> (12.07.2023.)
15. <https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/vitamini/vitamin-b12/izvori/> (12.07.2023.)
16. K. Juras i sur., Manjak vitamina B12 u djece, Liječ Vjesn, 133 (2011),39–50.
17. <https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/vitamini/vitamin-b12/nedostatak-u-organizmu/> (18.07.2023.)
18. M. Fenech, The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. Mutation Research 475 (2001), 57–67.

19. A. Pupić-Bakrač, A. Pervan, J. Pupić-Bakrač, J. Končurat, Extremely severe vitamin B12 deficiency – case presentation and review of literature, *Medicina fluminensis*, 55 (2019), 301-310.
20. O. Karmi, A. Zayed, S. Baraghehi, M. Qadi, R. Ghanem, Measurement of vitamin B12 concentration: a review on available methods, Department of Medical Laboratory Sciences, The IIOAB Journal (2011).
21. A. Martinko, Analitičke metode za određivanje vitamina, Završni rad, Zagreb, (2019).
22. X. Si1, T. Wang, Y. Ding, B. Liu, L. Luo1, Multi-Walled Carbon Nanotubes/Vitamin B12 Modified Glassy Carbon Electrode for Determination of P-hydroxyacetophenone, *Current Analytical Chemistry*, 11 (2015), 211-216.
23. O. Heudi, T. Kilinc, P. Fontannaz, E. Marley, (2006) Determination of Vitamin B12 in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction, *J Chromatogr A*, (2006), 63–68.
24. A. Michopoulos, A. B. Florou, M. I. Prodromidis, Ultrasensitive determination of vitamin B12 using disposable graphite screen-printed electrodes and anodic adsorptive voltammetry, *Electroanalysis* 27 (2015), 1876–1882.
25. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb (1999).
26. P. Westbroek, *Electrochemical methods*, 10 (2005), 37–69.
27. https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern_University/11%3A_Electrochemical_Methods (20.07.2023.)
28. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/In_Class_Activities/Electrochemical_Methods_of_Analysis/02_Text/7%3A_Electrochemical_Analytical_Methods/7.5%3A_Voltammetric_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/In_Class_Activities/Electrochemical_Methods_of_Analysis/02_Text/7%3A_Electrochemical_Analytical_Methods/7.5%3A_Voltammetric_Methods) (20.07.2023.)
29. C.C. Cheng, M.S. Young, S.W. Young, C.L. Chuang, An intelligent digital voltammetric system with multiple functions executed through stand-alone operation or pc-control, *Biomed Eng Appl Basis Comm*, 14 (2002), 218-236.
30. I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Mediaprint-Tiskara Hrastić d.o.o., Zagreb, 2010.
31. <https://www.als-japan.com/1021.html> (20.07.2023.)
32. <https://resources.pcb.cadence.com/blog/2021-differential-pulse-voltammetry-explained> (20.07.2023.)
33. K. Ivić, Utjecaj strukture površinski aktivne tvari na elektrokemijsko raslojavanje grafita, Završni rad, Zagreb (2016).
34. Ş. Kalayci, Ü. Ünal, G. Somer, Determination of Vitamin B12 Using Differential Pulse Polarography, *American Journal of Analytical Chemistry*, 11 (2020), 187-196.

35. D. F. Pereira, E. R. Santana, J. V. Piovesan, A. Spinelli, A novel electrochemical strategy for determination of vitamin B12 by Co(I/II) redox pair monitoring with boron-doped diamond electrode, *Diamond and Related Materials*, 105, (2020), 107793.

7. ŽIVOTOPIS



Anamaria Jovanović

Državljanstvo: hrvatsko Datum rođenja: 21/04/1998 E-adresa: anamaria.jovanovic112@gmail.com

Kućna: Kućan Ludbreški 46, 42230 Ludbreg (Hrvatska)

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJE: ISTRAŽIVAČKI SMJER

Odjel za kemiju [2021 – 2023]

Mjesto: Osijek

Zemlja: Hrvatska

Internetska stranica: <https://www.kemija.unios.hr/>

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJE

Odjel za kemiju [2017 – 2021]

Mjesto: Osijek

Zemlja: Hrvatska

Internetska stranica: <https://www.kemija.unios.hr/>

EKOLOŠKI TEHNIČAR

Graditeljska, prirodoslovna i rudarska škola Varaždin [2013 – 2017]

Mjesto: Varaždin

Zemlja: Hrvatska

OSNOVNA ŠKOLA

Osnovna škola Ludbreg [2005 – 2013]

Mjesto: Ludbreg

Zemlja: Hrvatska

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/Jezici: **hrvatski**

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE B2 ČITANJE B2 PISANJE A2

GOVORNA PRODUKCIJA B1

GOVORNA INTERAKCIJA B1

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

DIGITALNE VJEŠTINE

Rad na raunalu / MS Office (Word Excel PowerPoint) / Internet / Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer) / Društvene mreže

KONFERENCIJE I SEMINARI

14.međunarodni znanstveno stručni skup Hranom do zdravlja

[Osijek]

Electrochemical characterization of vitamin B12 and serotonin - **postersko priopćenje** (autori: Anamaria Jovanović, Ivana Jelavić, Dominik Goman, Anamarija Stanković, Martina Medvidović-Kosanović)