



# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ И ФАРМАКОГНОЗИЯ

УДК 615.35:543.544.5

## КОНТРОЛЬ СОПУТСТВУЮЩИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ КОКАРБОКСИЛАЗА ГИДРОХЛОРИД МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

**А.А. ЗИНЧЕНКО**

Украинский научный  
фармакопейный центр  
качества лекарственных  
средств

e-mail:

Zincheno@phukr.kharkov.ua

В статье изложены результаты разработки методики определения сопутствующих примесей субстанции кокарбоксилаза гидрохлорид, методом прямофазной жидкостной хроматографии. Приведена подробная методика и результаты определения валидационных характеристик. В отличие от используемых в настоящее время методик, разработанная методика позволяет исключить применение органических растворителей, при этом сократить время получения одной хроматограммы до 10 мин. Результаты валидационных исследований свидетельствуют о соответствии методики требованиям фармакопеев.

Ключевые слова: кокарбоксилаза, фосфотиамин, тиамин, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Препараты витамина В<sub>1</sub> широко используется в медицинской практике. Одним из таких препаратов является «кокарбоксилаза», представляющий собой хлорид эфир тиамин и пирофосфорной кислоты. Этот препарат применяют при легочной и печеночной недостаточности, диабете, сердечной недостаточности, хроническом алкоголизме и ряда других заболеваний [1, 2]. В промышленности кокарбоксилазу получают из тиамин по схеме (рис. 1):

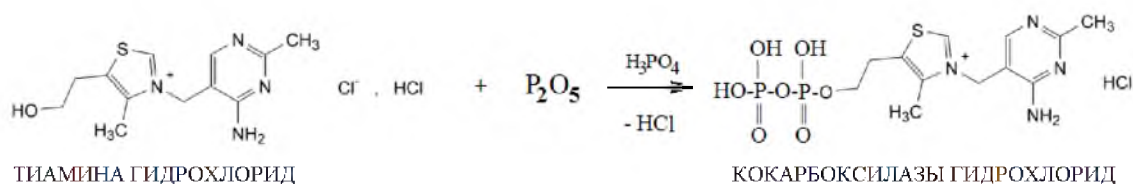


Рис. 1. Схема получения кокарбоксилазы

В процессе получения кокарбоксилазы образуются также эфир тиамин и о фосфорной кислоты (фосфотиамин), эфир дитиаминмонофосфорной кислоты, а также эфир тиамин и три-о-фосфорной кислоты (рис. 2). Основная часть этих соединений удаляется из конечного продукта в процессе очистки кокарбоксилазы, однако частично, эти вещества попадают в готовую субстанцию кокарбоксилазы.

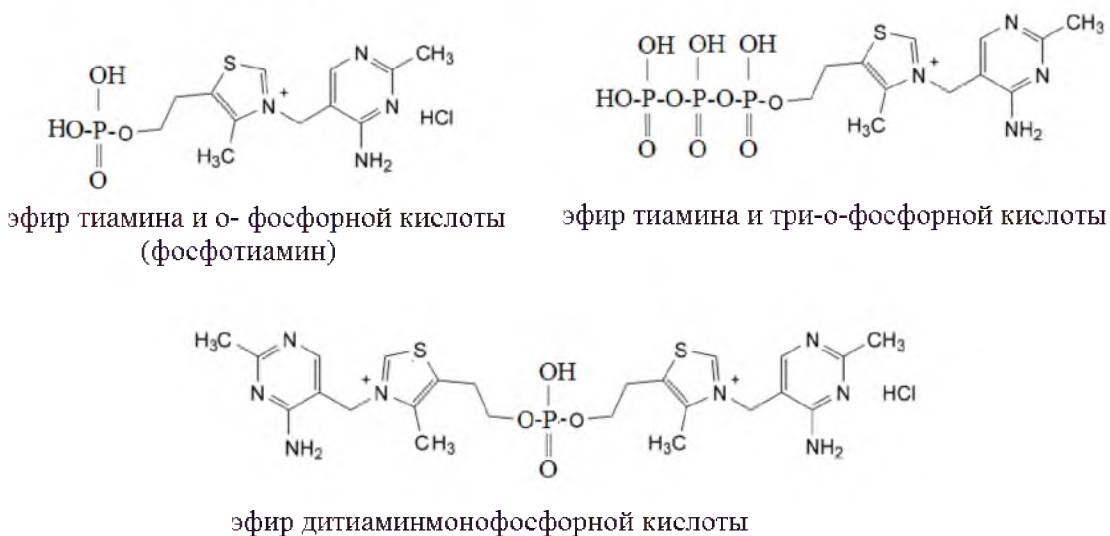


Рис. 2. Возможные примеси субстанции кокарбоксилазы гидрохлорида

Другой возможной примесью этого препарата может быть не вступивший в реакцию тиамин, а также фосфорная кислота. Таким образом, все перечисленные выше соединения могут быть примесями субстанции кокарбоксилазы, причем как технологическими, так и продуктами распада, за исключением эфира тиамина и три-о-фосфорной кислоты и эфира дитиаминмонофосфорной кислоты. В соответствии с современными требованиями к контролю качества лекарственного препарата, все возможные примеси субстанции кокарбоксилазы подлежат контролю и методика их определения должна быть включена аналитический нормативный документ.

Субстанция кокарбоксилазы в фармакопях ведущих стран не описана. В СССР было производство этого препарата и по действующей в то время фармакопейной статье содержание примесей контролировали методом ВЭЖХ с использованием колонки размером 80 мм × 2,0 мм, заполненной обращенно-фазовым сорбентом. В качестве подвижной фазы применяли раствор фосфатного буферного раствора рН 6,0 с тетрабутиламмонием гидросульфатом и ацетонитрилом в соотношении 95:5. Условия хроматографирования этой методики были ориентированы на использование микроколоночного хроматографа «Милихром», и методика позволяла определять основную примесь кокарбоксилазы – фосфотиамин.

За прошедшие с момента развала СССР годы в Российской Федерации и в некоторых странах СНГ было организовано несколько производств субстанции кокарбоксилазы. Поскольку технологическая схема производства этого препарата практически не изменилась, в нормативную документацию с небольшими изменениями, связанными с размерами колонки и температурным режимом хроматографирования, включали методику, разработанную еще в СССР. Однако с ростом требований к качеству субстанции и появлением на рынке СНГ препаратов европейской и китайской производителей [3] возникла практическая необходимость в методике, которая позволит провести определение всех возможных примесей кокарбоксилазы при минимальных затратах на проведение анализа.

**Целью** данной работы являлась разработка методики количественного определения возможных примесей, субстанции кокарбоксилазы и изучение основных метрологических характеристик разработанной методики.

Сама субстанция тиамин хлорида описана во всех фармакопях ведущих стран [4-8]. В фармакопейных монографиях на этот препарат, для определения сопутствующих примесей применяют метод ВЭЖХ. Поскольку тиамин является катионом, в состав подвижной фазы вводят гексансульфонат натрия (или аналогичный реагент), который модифицирует сорбент, превращая колонку фактически в катионо-обменную, что обеспечивает приемлемые характеристики колонки для разделения примесей тиамин. В процессе производства кокарбоксилазы, при введении в структуру молекулы фрагмента пирофосфорной кислоты (рис. 1) тиамин уже входит в структуру аниона. Поэтому для разделения близких по природе сопутствующих примесей можно либо использовать соответствующий ион-парный реагент, как это было сделано в методике, разработанной в СССР, либо применить анионо-активную колонку. Сравнивая основные характеристики двух вариантов методики, такие как время получения одной хроматограммы,



стоимость растворителей, реактивов и расходных материалов, предпочтение отдали второму варианту.

В литературе описано несколько методик совместного определения тиамин, фосфотиамин и кокарбоксилазы. В большинстве работ определение проводят на колонке с обращенно-фазовым сорбентом с группами C18 или амид-C16 [9-11] или на двух последовательно соединенных колонках с октильными и аминными группами [12]. Во всех этих работах в качестве подвижной фазы применяют смесь фосфатного буферного раствора и ацетонитрила или метанола. В разработанной авторами методике использовали одну колонку, заполненную сорбентом с привитыми пропиламинными группами. Этот сорбент позволяет получить приемлемое разделение определяемых веществ с использованием подвижной фазы, состоящей только из воды с добавками фосфорной кислоты. Изменяя концентрацию фосфорной кислоты, можно менять время удерживания и коэффициент симметрии пика кокарбоксилазы, а также коэффициент разделения пиков тиамин и фосфотиамин и время получения одной хроматограммы (рис. 3).

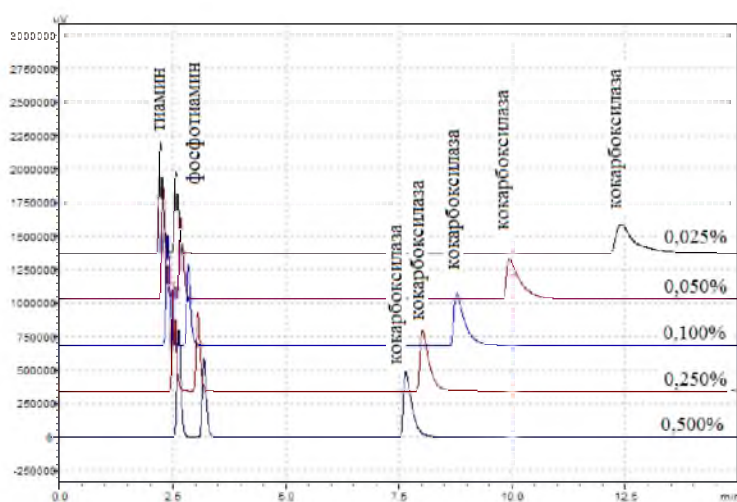


Рис. 3. Хроматограммы модельного раствора, полученные при использовании подвижной фазы с концентрацией фосфорной кислоты от 0,025% до 0,500%

Характеристики хроматографической системы при использовании подвижной фазы с концентрацией фосфорной кислоты от 0,025% до 0,500% представлены в табл. 2.

Таблица 2  
Характеристики хроматографической системы, при использовании подвижной фазы с концентрациями фосфорной кислоты от 0,025% до 0,500%

Наименование вещества	Характеристика	Концентрация фосфорной кислоты в ПФ (в %)				
		0,025	0,050	0,100	0,250	0,500
Тиамин	Время удерживания (мин.)	2,231	2,291	2,383	2,522	2,628
	Коэффициент симметрии $T_{10\%}$	1,339	1,337	1,329	1,326	1,321
	Эффективность хроматографической системы (теор. тарелки)	2906	3061	3359	3758	3932
Фосфотиамин	Время удерживания (мин.)	2,574	2,680	2,842	3,050	3,187
	Коэффициент симметрии $T_{10\%}$	1,393	1,369	1,355	1,340	1,338
	Эффективность хроматографической системы (теор. тарелки)	3473	3709	4217	4823	5090
Кокарбоксилаза	Коэффициент разделения тиамин/фосфотиамин	2,015	2,272	2,703	3,108	3,229
	Время удерживания (мин.)	12,407	9,942	8,773	8,021	7,652
	Коэффициент симметрии $T_{10\%}$	2,801	2,641	2,508	2,198	2,096
	Эффективность хроматографической системы (теор. тарелки)	7277	7301	7459	8313	8624

Уменьшение времени удерживания пиков кокарбоксилазы с увеличением концентрации фосфорной кислоты в подвижной фазе можно объяснить процессом вытеснения фосфат-



ионами фосфорной кислоты фрагментов пиродифосфорной кислоты кокарбоксылазы с активных центров сорбента. При этом возрастает количество фосфат-ионов, которые взаимодействуют с аминными группами неподвижной фазы, т.е. на определенный момент времени эта часть фосфат-ионов становится неподвижной. С этими неподвижными ионами взаимодействуют фосфотиамин и тиамин, за счет чего происходит увеличение времени удерживания и возрастает коэффициент разделения этих веществ.

Исходя из хроматограмм, представленных на рис. 3, предпочтение, с точки зрения критериев хроматографического разделения, можно было бы отдать подвижной фазе с максимальной концентрацией фосфорной кислоты – 0,5%. Но учитывая, что с ростом концентрации кислоты время эксплуатации колонки снижается, была выбрана подвижная фаза, содержащая 0,1% фосфорной кислоты.

В ходе проведения предварительных исследований на 5 сериях препарата производства ГП «Завод химических реактивов», Украина, было установлено, что эфир тиамина и три-о-фосфорной кислоты в препарате отсутствует, поэтому в разработанную методику не было включено определение этого вещества.

#### **Материалы и оборудование.**

При разработке методики и изучении валидационных характеристик использовали жидкостный хроматограф модели LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) следующей комплектации: два насоса LC-20AD, спектрофотометрический детектор SPD-20AV, автоматический инжектор SIL-20, термостат колонок CTO-20A.

Колонка стальная, размером 150 мм × 4,0 мм, заполненная сорбентом «ReproSil-Pur NH<sub>2</sub>», размер частиц 3 мкм, производство «Dr. Maisch», Германия.

Тиамин монофосфат хлорид дигидрат (фосфотиамин) – производство Sigma-Aldrich, кат № T8637, с содержанием основного вещества 99,9 %.

Кокарбоксылаза, субстанция – производства ГП «Завод химических реактивов», Украина, содержание основного вещества 99,88 %.

Образец эфира дитиаминмонофосфорной кислоты получен в лабораторных условиях, при реакции избытка тиамина гидрохлорида с фосфорным ангидридом.

При хроматографировании использовали трижды перегнанную воду с электропроводимостью 0,9 мкСм.

#### **Методика.**

Приготовление испытуемого раствора. Около 50 мг (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы (ПФ), доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фторопластовый фильтр с размером пор не более 0,5 мкм.

Приготовление раствора сравнения фосфотиамин. Около 30 мг (точная навеска) стандартного образца (СО) фосфотиамин помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл ПФ, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают (исходный раствор фосфотиамин).

3,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы. 30 мг тиамина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл ПФ, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают.

3,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 3,0 мл исходного раствора фосфотиамин, доводят объем ПФ до метки и перемешивают.

#### **Измерение:**

По 5 мкл испытуемого раствора, раствора сравнения фосфотиамин и раствора для проверки пригодности хроматографической системы хроматографируют на жидкостном хроматографе в следующих условиях:

– колонка стальная, размером 150 мм × 4,0 мм, заполненная сорбентом «ReproSil-Pur NH<sub>2</sub>», размер частиц 3 мкм;

– подвижная фаза – 0,1 % раствор кислоты фосфорной;

– скорость ПФ – 0,5 мл/мин;

– температура колонки – 35 °С;

– длина волны детектирования – 250 нм.

Содержание фосфотиамин и любой другой примеси в препарате (X), в процентах, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_i \times m_o \times 50 \times 3 \times P \times 100}{S_o \times m \times 100 \times 100 \times 100} = \frac{S_i \times m_o \times 3 \times P}{S_o \times m \times 200}$$



где  $S_0$  – среднее значение площади пика фосфотиамина, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения фосфотиамина;

$S_i$  – среднее значение площади пика фосфотиамина или любой другой примеси, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора;

$m_0$  – масса навески фосфотиамина, в миллиграммах;

$m$  – масса навески препарата, в миллиграммах;

$P$  – содержание основного вещества в СО фосфотиамина, в процентах.

Содержание фосфотиамина в препарате должно быть не более 1,0 %.

Содержание любой другой примеси, в пересчете на фосфотиамин, в препарате должно быть не более 0,1 %.

Суммарное содержание фосфотиамина и других примесей, в пересчете на фосфотиамин, должно быть не более 1,0 %.

В качестве критериев пригодности хроматографической системы использованы:

– эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику фосфотиамина на хроматограммах раствора сравнения фосфотиамина которая должна быть не менее 3500 теоретических тарелок;

– коэффициент разделения пиков тиамина и фосфотиамина, рассчитанный из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы, должен быть не менее 2;

– относительное стандартное отклонение площадей пиков фосфотиамина, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения фосфотиамина, должно быть: для 3 параллельных введений – не более 1,34 %; для 4 параллельных введений – не более 1,92 %; для 5 параллельных введений – не более 2,37 % [13].

Типичные хроматограммы раствора сравнения испытуемого раствора препарата, СО фосфотиамина и раствора для проверки хроматографической системы представлены на рис. 4-6.

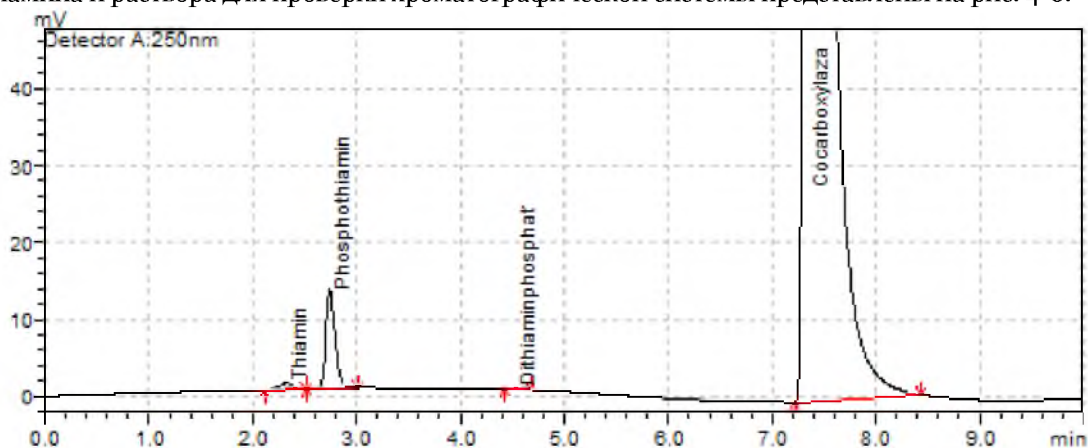


Рис. 4. Хроматограмма испытуемого раствора

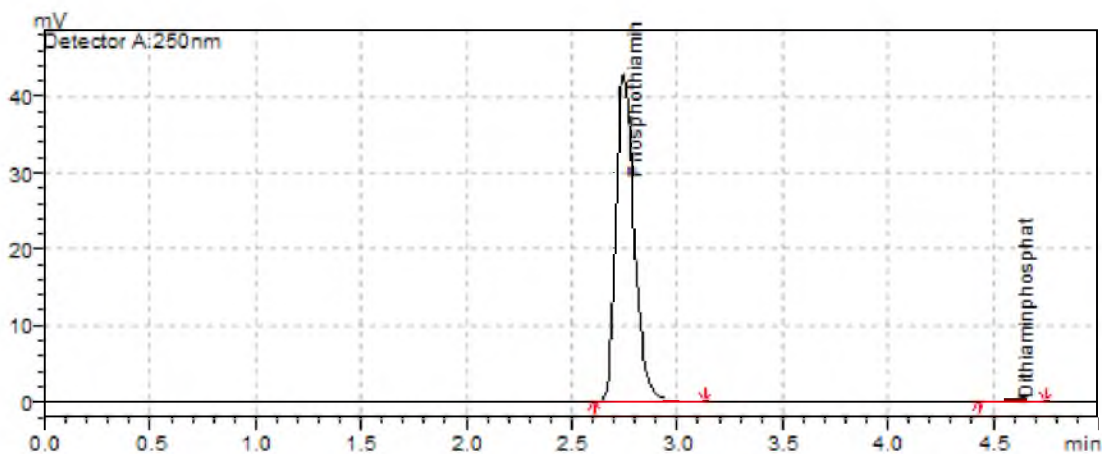


Рис. 5. Хроматограмма раствора сравнения фосфотиамина

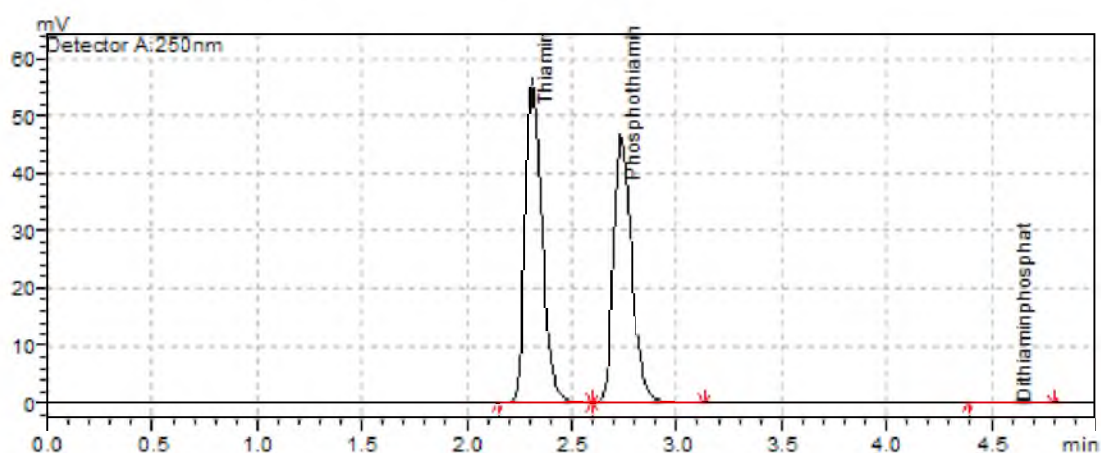


Рис. 6. Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы

**Валидация методики:**

В соответствии с [14], валидацию методики проводили по характеристикам селективность, правильность, прецизионность (сходимость), линейность и диапазон применения.

Кроме того, была рассчитана предельная расчетная неопределенность методики количественного определения фосфотиамин и определен предел обнаружения фосфотиамин. Все расчеты критериев приемлемости валидационных характеристик были рассчитаны и приняты как для испытаний количественного определения сопутствующих примесей, т.е. неопределенность результата методики не должна превышать 5%.

Селективность методики подтверждается полным разделением пиков тиамин, фосфотиамин, эфира дитиаминмонофосфорной кислоты и кокарбоксилаза. А также совпадением времен удерживания перечисленных веществ на хроматограммах испытуемого раствора или модельных растворов с временем удерживания основных пиков на хроматограммах растворов сравнения (рис. 7).

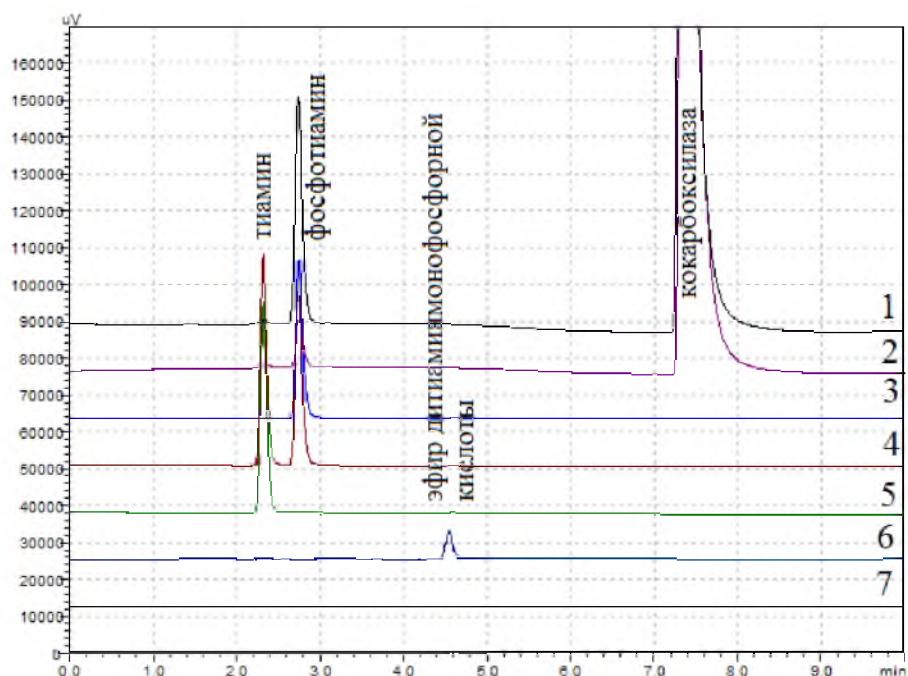


Рис. 7. Хроматограммы модельного раствора препарата с добавкой фосфотиамин (1), испытуемого раствора (2), раствора сравнения фосфотиамин (3), раствора для проверки пригодности хроматографической системы (4), раствора тиамин (5), раствора эфира дитиаминмонофосфорной кислоты (6) и растворителя (7)



Исследование характеристик правильность, прецизионность (сходимость), линейность и диапазон применения проводили на модельных растворах препарата с добавками фосфотиамин в концентрациях, соответствующих диапазону от 25% до 225% по отношению к предельно допустимой концентрации (для данного случая – 1,0%). Выбор этого диапазона обусловлен значительным разбросом предельно допустимой концентрации фосфотиамин в кокарбоксилазе разных производителей (от 1% до 4%) и данными производителей субстанции о реальном содержании фосфотиамин в препарате.

Полученные при хроматографировании модельных растворов результаты приведены в табл.3.

Таблица 3

**Результаты анализа модельных растворов, содержащих от 25 % до 225 % фосфотиамин по отношению к предельно допустимой концентрации, и их статистическая обработка**

№ раствора	Введено в % от номинальной концентрации ( $X_i$ , факт., %)	Найдено в % от номинальной концентрации ( $Y_i$ , %)	Найдено в % к введенному $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$
1	25	24,86	99,43
2	50	49,49	98,99
3	75	75,60	100,80
4	100	100,38	100,38
5	125	125,22	100,17
6	150	149,79	99,86
7	175	174,28	99,59
8	200	199,00	99,50
9	225	225,58	100,26
Среднее, $Z_{cp}$ , % =			99,886
Относительное стандартное отклонение, $RSD_z$ , % =			0,566
Относительный доверительный интервал $\Delta_z \% = t(95\%, 9 - 2) \times RSD_z = 1,895 \times 0,566 =$			1,076
Критическое значение для сходимости результатов $\Delta_{As}$ , % =			1,6
Систематическая ошибка $\delta \% =  Z_{cp} - 100  =$			0,114
Критерий незначимости систематической ошибки:			
1) статистическая незначимость: $\delta < \Delta_z : \sqrt{9} = 1,076 : 3 = 0,359 \% > 0,114 \%$			Выполняется
Если не выполняется 1), то $\delta \leq \max \delta$ :			Выполняется
2) практическая незначимость: $\delta \% \leq 0,32 \times 1,6 = 0,51 \% > 0,114 \%$			Выполняется
Общий вывод о методике			КОРРЕКТНА

Из данных, приведенных в табл. 3, следует, что методика количественного определения фосфотиамин не имеет статистически значимой систематической ошибки, характеризуется достаточной правильностью и сходимостью (прецизионность) во всем диапазоне концентраций (от 25 % до 225%) и является корректной.

График линейной зависимости найденного количества фосфотиамин от введенного и результаты статистической обработки представлены на рис. 8 и в табл. 4.

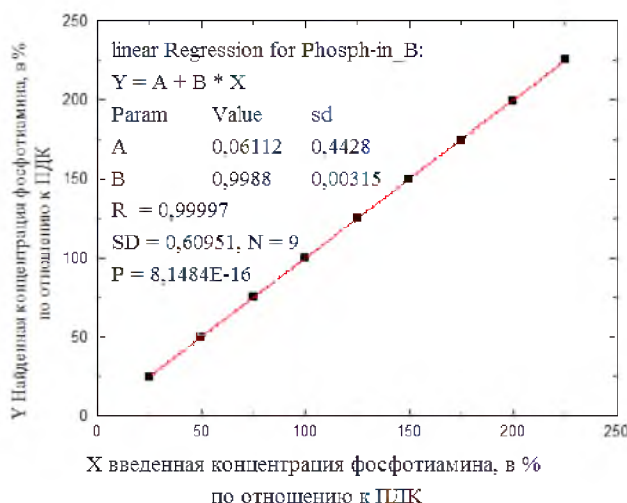


Рис. 8. Линейная зависимость найденной концентрации фосфотиамина от его введенной концентрации (в нормализованных координатах)

Таблица 4

**Метрологические характеристики линейной зависимости найденной концентрации фосфотиамина от его введенной концентрации**

Параметры	Значения	Требования 1	Требования 2	Заключение
b	0,9988			
S <sub>b</sub>	0,00315			
a	0,006112	<  1,88	<  0,683	Выдерживается по 1 критерию
S <sub>a</sub>	0,4428			
RSD <sub>o</sub>	0,60951			
RSD <sub>o</sub> /b	0,6102	<  0,84		Выполняются
r	0,99997	≥  0,99988		Выполняются

Как следует из представленных данных, требования к параметрам линейной зависимости выполняются, то есть линейность методики количественного определения фосфотиамина подтверждается в диапазоне концентраций от 25% до 225% от предельно допустимого значения.

Неопределенность методики ( $\Delta_{As}$ ) складывается из неопределенности внесенной пробоподготовки ( $\Delta_{SP}$ ) и неопределенности конечной аналитической операции – хроматографирования и расчета площадей пиков определяемого вещества ( $\Delta_{FAO}$ ):

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}$$

Расчетная неопределенность операций приготовления испытуемого раствора и раствора сравнения препарата составляет 0,87 %. Неопределенность конечной аналитической операции рассчитывали по результатам хроматографирования модельного раствора с концентрацией фосфотиамина соответствующей предельно допустимой (1%) и раствора сравнения фосфотиамин. Суммарное значение неопределенности результатов конечной хроматографической операции, по трем параллельным хроматограммам каждого из растворов составляет 0,95%. Отсюда следует, что суммарная неопределенность методики ( $\Delta_{As}$ ) составляет 1,3%. Это значение не превышает предельно допустимую величину – 1,6%.

Проведенные исследования основных валидационных характеристик методики определения фосфотиамин и других сопутствующих примесей препарата кокарбоксилаза, субстанция показывают, что по характеристикам селективность, правильность, прецизионность (сходимость), линейность, разработанная методика удовлетворяет фармакопейным требованиям [14] к методикам количественного определения сопутствующих примесей.

**Выводы.**

1. Разработана методика определения сопутствующих примесей в субстанции кокарбоксилазы методом ВЭЖХ. Методика отличается от используемой в настоящее время низкой себестоимостью одного анализа и значительным сокращением времени получения одной хроматограммы (менее 10 мин.).





2. Исследование основных валидационных характеристик методики показало, что методика соответствует требованиям, предъявляемым к методикам количественного определения сопутствующих примесей.

### Литература

1. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, 2006. – 1200 с.
2. Островский Ю.М. Кокарбоксилаза и другие тиамин-фосфаты / Ю.М. Островский. – Минск: Наука и техника, 1974.
3. Регистр лекарственных средств России РЛС Энциклопедия лекарств. – 15-й вып / Гл.ред. Г.Л.Вышковский, – М.: РЛС-2007, 2006. – С.1488.
4. European Pharmacopoeia. 7<sup>th</sup> ed. – Strasbourg: Council of Europe, V1,V2. 2010. – 3265 p
5. The Japanese Pharmacopoeia XVI ed. – 2011. – 2319 p.
6. United States Pharmacopoeia. 30 ed.- Rockville, 2010 – 2569 p
7. Pharmacopoeia of the people's Republic of China (English Edition 2005) Vol. IIa, Chemical Industry Press, Beijing, 2005 – p 830
8. Кузьмин, С.В. Ион-парная обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография в идентификации и количественном определении примеси фосфотиамин в гидрохлориде кокарбоксилазы / С.В. Кузьмин, Е.Е. Ипина, М.Л. Шипкова, В.А. Козлов // Хим-фарм. журн. – 1997. – Т 31, № 5. – С.54-56.
9. F. Aguilar, U.R. Charrondiere, B. Dusemund, P. Galtier, J. Gilbert, D.M. Gott, S. Grilli, R. Guertler, G.E.N. Kass, J. Koenig, C. Lambre, J-C. Larsen, J-C. Leblanc, A. Mortensen, D.Parent-Massin, I. Pratt, I. Rietjens, I. Stankovic, P. Tobback, T. Verguieva, R. Woutersen., Benfotiamine, thiamine monophosphate chloride and thiamine pyrophosphate chloride, as sources of vitamin B1 added for nutritional purposes to food supplements., *The EFSA Journal* (2008) 864, p. 1-31.
10. Бендрьшев А.А. Определение водорастворимых витаминов в витаминных комплексах, премиксах, биологически-активных добавках и фармацевтических препаратах методом высокоэффективной хроматографии с градиентным элюированием / А.А. Бендрьшев, Е.Б. Пашкова, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Химия. – 2010. – Т.51, №4.
11. Rada Amidžić, Jasmina Brborić, Ol.Ivera Čudina and Sote Vladimirov, RP-HPLC Determination of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>,B<sub>6</sub>, folic acid and B<sub>12</sub> in multivitamin tablets, *O. Serb. Chem. Soc.* 70 (10) 1229-1235 (2005).
12. S. Backermann, C. Poel, W. Ternes., Thiamine Phosphates in Egg Yolk Granules and Plasma of Regular and Embryonated Eggs of Hens and in Five – and Seven-Day-Old Embryos. *Poult. Sci.*, (2008) 87, 108-115.
13. Державна Фармакопея України / Держ. Підпр-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: ПІРЕГ, 2001. – Доповнення 1, 2004. – 520 с.
14. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна и др.; Разработчики В.Л. Багирова, А.И. Гризодуб, Т.Х. Чибилев, Д.А. Леонтьев, Н.А. Ляпунов и др. – М.: Фармацевтическая промышленность, 2007. – 58 с.

## CONTROL OF RELATED SUBSTANCE IMPURITIES IN COCARBOXYLASE HYDROCHLORIDE BY METHOD OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

**A.A. ZINCHENKO**

*Ukrainian research center  
pharmaceutical grade  
quality of medicines*

*E-mail:*

*zinchenko@phukr.kharkov.ua*

The article presents results of the development of methods for determining the substance associated impurities kokarboksilaza hydrochloride pyramofaznoy by liquid chromatography. Provides a detailed definition of the method and results validation characteristics. Unlike the currently used techniques developed method avoids the use of organic solvents, and the time of reception of a chromatogram to 10 minutes. The results of validation studies suggest methods according to Pharmacopoeia.

Key words: kokarboksilaza, fosfotiamin, thiamine, high performance liquid chromatography