

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
ХІМІЇ ЛІКІВ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ
(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Кількісне визначення тіоколхікозиду та його супровідних речовин у складі досліджуваної субстанції»

Виконав: здобувач вищої освіти 6 курсу, групи 1082А
напряму підготовки (спеціальності)
226 «Фармація, промислова фармація»
(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання
Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»
«Фармація»
(назва освітньої програми)

Ковальчук Олександр Володимирович
(прізвище та ініціали)

Керівник: проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: к.б.н. Мелешко Р.А.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2025-2026 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	10
 РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ, ВЛАСТИВОСТІ ГЛІКОЗИДІВ.....	10
1.1. Особливості хімічної будови	10
1.2. Біологічна активність	15
 РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ, ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ГЛІКОЗИДІВ.....	19
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	19
 РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	24
 ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36
SUMMARY.....	41
ДОДАТОК 1.....	42

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікромметр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – нанометр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

°C – градуси Цельсія

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спин-спінової взаємодії, герци

MOR – μ -opioid receptor

ВСТУП

Актуальність теми. Тіоколхікозид — міорелаксант центральної дії. Він використовується для лікування болісних м'язових спазмів, спричинених травмами хребта, захворюваннями опорно-рухового апарату, при патологіях спинного мозку. Впливає на центральну нервову систему, зменшує м'язовий тонус та блокує больові сигнали. Тіоколхікозид має протизапальні властивості, полегшуючи біль, набряк та рухливість.

Тіоколхікозид діє наступним чином:

- Впливає на ГАМК-ергічні, на гліцинергічні рецептори в мозку та спинному мозку.
- Знижує спазми скелетної мускулатури.
- Має протизапальний ефект.

Аналіз тіоколхікозиду регламентується міжнародними стандартами.

Європейська фармакопея (European Pharmacopoeia). Тіоколхікозид (актуальне видання 11.0, 2025) під назвою Thiocolchicoside crystallised from ethanol. Європейська фармакопея (Ph. Eur.): це основний міжнародний стандарт. Містяться офіційні монографії Thiocolchicoside crystallised from ethanol (Тіоколхікозид, кристалізований з етанолу) та Thiocolchicoside hydrate.

1. Основні методи аналізу згідно з монографією:

Ідентифікація: ІЧ-спектрофотометрія (порівняння зі стандартним зразком CRS).

Кількісне визначення: Метод рідинної хроматографії (ВЕРХ/HPLC) для оцінки чистоти та вмісту діючої речовини, потенціометричне титрування.

Контроль домішок: Визначення споріднених сполук методом ВЕРХ.

Державна Фармакопея України (ДФУ): На 2025 рік в Україні діють стандарти гармонізовані з Європейською фармакопеєю. У червні 2025 року

було затверджено Додаток № 8 до II видання ДФУ, впровадження європейських методів аналізу.

Для аналізу широко використовуються методи керівництв ІСН:

УФ-спектрофотометрія: при довжинах хвиль 259.8 нм або 280 нм.

НРТLC (ВЕ-ТШХ): Тонкошарова хроматографія високої роздільної здатності для експрес-аналізу.

LC-MS/MS: дослідження біоеквівалентності.

Основні методи:

ВЕРХ (HPLC): метод кількісного визначення та контролю споріднених домішок.

ІЧ-спектрофотометрія: для ідентифікації речовини порівняння зі стандартним зразком.

Потенціометричне титрування: альтернативний метод кількісного визначення.

УФ-спектрофотометрія: для аналізу готових лікарських форм (таблеток, розчинів)

Тіоколхікозід є напівсинтетичним похідним колхікозиду (природного глікозиду, міститься в рослині Gloriosa superba). Хімічна класифікація. За своєю структурою належить до групи трополонових алкалоїдів (похідних колхіцину).

Основні компоненти структури. Молекула тіоколхікозиду складається з чотирьох частин:

- Трициклічне ядро (скаффолд колхіцину): бензольне кільце, кільце семичленне і семичленне трополонове кільце.

- Тіометильна група ($-\text{SCH}_3$): ключова відмінність від колхіцину. У кільці «С» у положенні 10 замість метоксигрупи ($-\text{OCH}_3$) знаходиться сірковмісна група, вона знижує загальну токсичність молекули проти колхіцином.

- Ацетамідна група: знаходиться в положенні 7 кільця «В».

- Глікозидний залишок: До кільця «А» у положенні 2 приєднана молекула глюкози, це робить речовину розчинною у воді (глікозид).

Хімічна назва (IUPAC): *N*-[(7S)-3-(β -D-glucopyranosyloxy)-1,2-dimethoxy-10-(methylsulfanyl)-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-7-yl]acetamide.

Особливості будови та дії. Наявність глікозидного фрагмента та тіометильної групи зумовлює його спорідненість до рецепторів ГАМК (GABA), гліцинових рецепторів у центральній нервовій системі. Завдяки цьому структура препарату дозволяє ефективно блокувати передачу нервових імпульсів. Їх спричиняють м'язовий спазм, не надаючи при цьому вираженого курареподібного або паралізуючого ефекту.

Відповідно до стандартів Європейської фармакопеї (Ph. Eur. 11.0, 2025) аналізують ряд специфічних домішок:

- Домішка В (Thiocolchicine/Тіоколхіцин): продукт без глікозидного залишку (аглікон).

- Домішка D: споріднене з'єднання, яке визначається під час перевірки придатності системи.

- Домішка E (N-Desacetyl-N-formyl thiocolchicoside): дезацетильована і потім формована похідна.

- Домішка H (10-Demethoxy colchicoside): з'єднання, в якому відсутня метоксигрупа в 10-му положенні.

- Домішка L: ще одна специфічна технологічна домішка, яку контролює метод ВЕРХ.

Метаболіт M2 (3-деметилтіоколхіцин). Важливо відрізнити домішки у субстанції від метаболітів в організмі. Тіоколхікозид розщеплюється в організмі до метаболіту M2 (3-demethylthiocolchicine). Він визнаний потенційно генотоксичним (на генетичний матеріал клітин, що діляться). Через нього в 2025 зберігаються суворі обмеження на тривалість прийому препарату.

Методи контролю. Для ідентифікації та кількісного визначення цих домішок фармакопеї наказують використання:

1. ВЕРХ (HPLC): з використанням спеціального стандартного зразка «Thiocolchicoside for system suitability CRS» - містить суміш домішок (D, E, G, H, K і L) для калібрування хроматографа.

2. Тонкошарова хроматографія (TLC): для попередньої оцінки чистоти.

Контроль цих домішок є критичним, оскільки вони можуть впливати можуть впливати на токсикологічний профіль препарату, стабільність при зберіганні [1-10, 27, 28].

Актуальним завданням експериментальної роботи є впровадження високоселективного методу ВЕРХ для ідентифікації та кількісного визначення АФІ Тіоколхікозиду, а також визначення чистоти випробовуваної субстанції.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є ідентифікація, кількісне визначення та випробування на чистоту субстанції АФІ Тіоколхікозиду методом ВЕРХ.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати методом ВЕРХ субстанцію АФІ Тіоколхікозиду;
- визначити чистоту досліджуваної субстанції АФІ Тіоколхікозиду хроматографічним методом ВЕРХ (присутність супровідних речовин);

- адаптувати методики дослідження та розробити умови дослідження, які дозволять захистити структуру молекули речовин від хімічної деградації.

Методи дослідження. ВЕРХ, рідинний хроматограф Dionex Ultimate 3000 з діодно-матричним детектором. Колонка Acquity UPLC BEH Phenyl: Колонка: розмір $l = 0,10$ м, $\varnothing = 2,1$ мм; стаціонарна фаза — енд-кепована етилен-мосткова фенілсіліл-силікагель для хроматографії (гібридний матеріал) R (1,7 мкм). Температура колонки: 25 °С. Комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у осучасненні фармацевтичного аналізу шляхом впровадження високоселективного хроматографічного методу ВЕРХ у аналіз АФІ - субстанції ТІОКОЛХІКОЗИДУ та визначення її чистоти.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на міжнародній науково-практичній конференції

Публікації: За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 42, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 28.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ГЛІКОЗИДІВ

1.1. Особливості хімічної будови

Тіоколхікозид – це фармакологічна сполука, що використовується в клінічній практиці як міорелаксант при лікуванні болісних захворювань опорно-рухового апарату - гострий біль, біль у шиї та інші стани, що викликають м'язову скутість. Європейське агентство з лікарських засобів (ЕМА) рекомендувало обмежити використання цього препарату. Повідомлялося про потенційні генотоксичні ефекти, відому епілептогенну та гепатотоксичну активність. Це призвело до рішення обмежити використання ін'єкційних або пероральних препаратів з тіоколхікозидом. Однак, препарати з тіоколхікозидом, широко використовуються в клінічній практиці [1-5].

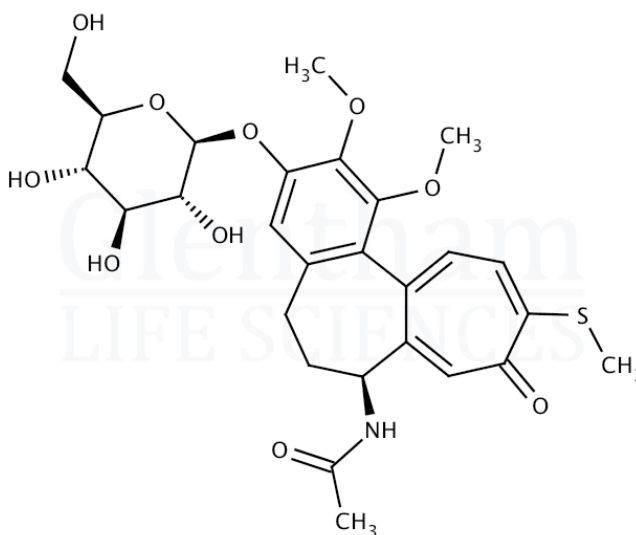


Рисунок 1.1.1. Хімічна структура Тіоколхікозиду.

Повідомлялося про ефекти тіоколхікозиду щодо полегшення болю при захворюваннях опорно-рухового апарату. Незрозуміло, чи є вплив на лікування болю клінічно значущим у порівнянні з мінімально важливою різницею (MIP). Без чіткого розуміння ефективності тіоколхікозиду в лікуванні болю опорно-рухового апарату важко оцінити, чи залишається виправданим використання цього лікування. Таким чином, узагальнено та оцінено дані, отримані з рандомізованих клінічних досліджень (РКД).

Протокол огляду зареєстровано на PROSPERO (CRD42024568209). Результати представлені відповідно до рекомендацій PRISMA.

Пошук літератури проведено в базах даних PubMed, Scopus, MedRxiv, платформи реєстру міжнародних клінічних випробувань BOOЗ. Джерела повідомляють про результати рандомізованих контрольованих досліджень (РКД). Вони оцінюють ефективність тіоколхікозиду порівняно з плацебо або відсутністю впливу у пацієнтів з опорно-руховим больовим синдромом.

Якщо втручання було представлено тіоколхікозидом + іншим препаратом, дослідження вважалося придатним. Якщо препаратом порівняння було плацебо + інший препарат – оцінка проводилася окремо.

Усі результати ефективності вважалися придатними. Було проведено пошук посилань на включені дослідження для додаткових досліджень.

Розбіжність між авторами вирішувалася шляхом обговорення з третім автором (СМ). Методологічну якість кожної статті оцінювали за допомогою інструменту «Ризик упередженості 2». Інструмент Cochrane RoB 2 був обраний завдяки його надійній структурі для оцінки упередженості в рандомізованих дослідженнях. Існує кілька інших інструментів оцінки ризику упередженості. Кожен з яких має обмеження через варіації в конкретних областях, які вони охоплюють, фіксований характер їхніх критеріїв.

Підхід GRADE використаний для визначення достовірності доказів для кожного вилученого результату [6-11].

Основним результатом було зменшення інтенсивності болю, оцінене за допомогою балів за візуальною аналоговою шкалою (VAS). Були вилючені інші показники інтенсивності болю, включаючи шкалу ВАС, позначену лікарем, бал порогу больового тиску, бал болю під час руху, наявність м'язових спазмів.

Виділено показники функціональних порушень, включаючи відстань від руки до підлоги, бал за тестом Шобера, показники глобальної оцінки, показники зниження активної та пасивної сегментарної рухливості.

Для кожного дослідження обчислювали середню різницю (CP) між групою втручання та контрольною групою, використовуючи середні показники за шкалою VAS, стандартні відхилення (CV).

У разі відсутності числових даних або CV намагалися зв'язатися з авторами. Результати, які не були представлені у числовому вигляді, а у графічній формі, оцінювалися шляхом візуального огляду графіків. Стандартні відхилення (SD) імпутувалися з використанням об'єднаних стандартних відхилень включених досліджень, дотримуючись методів, описаних Фурукавою.

Дані окремих досліджень метааналізовані з використанням методу зворотної дисперсії випадкових ефектів для врахування дисперсії між дослідженнями. Враховувалися обчислення підсумкової таблиці середніх відмінностей за шкалою VAS з 95% довірчими інтервалами (ДІ), оцінки гетерогенності між дослідженнями за допомогою статистики I².

Метааналізи проводилися для досліджень з подібним дизайном та подальшим спостереженням, були представлені стратифікованими за шляхами введення.

Аналізи чутливості проводилися, виключаючи дослідження з імпутованими даними або з місцевими та/або пероральними препаратами. Це необхідно, щоб врахувати гетерогенність якості даних та шляхів введення включених досліджень.

Був наданий наративний синтез шляхом узагальнення оцінок ефекту за допомогою таблиці доступних даних [11-15].

Аналізи виконували за допомогою Review Manager 5.4. Об'єднані оцінки ефекту порівнювали з MID (індексом болю). Поріг MID використовувався для оцінки узгодженості доказів.

У літературі повідомляється про різні пороги MID для оцінки болю за шкалою VAS. Вони відрізняються залежно від типу умов та оцінюваного стану та коливаються від 0,8 до 4 балів за шкалою від 0 до 10 [15-20]. Встановлено консервативний поріг MID в 1 бал, оскільки він часто використовується для значень VAS. Він також є порогом, який найчастіше повідомляється у валідаційних дослідженнях [20-22].

Початковий пошук виявив 127 звітів; 34 було видалено, а 80 було виключено на етапі скринінгу назви/анотації. Підсумок характеристик включених досліджень: лише чотири були опубліковані за останні 20 років. Переважна більшість ($n = 7$) оцінювала ефективність тіоколікозиду у пацієнтів з гострим болем у попереку.

Робоче визначення болю в попереку варіювалося в різних включених дослідженнях, з неоднорідними критеріями включення щодо тривалості та інтенсивності болю. Результатами були показники інтенсивності болю, включаючи показники ВАС, показник порогу больового тиску, показник болю під час руху та наявність м'язових спазмів.

Єдине РКД, яке оцінювало ефективність тіоколікозиду у вибірці — пацієнти з остеоартритом — повідомляло про ефективність препарату з точки зору зниження активної та пасивної сегментарної рухливості.

Вилучено доступні дані щодо безпеки: у контрольній групі було зареєстровано лише одну серйозну побічну подію (госпіталізація через біль у

грудях), всі інші події були зареєстровані як легкі та збалансовані між групою втручання та контрольною групою (рис. 1.1.2)

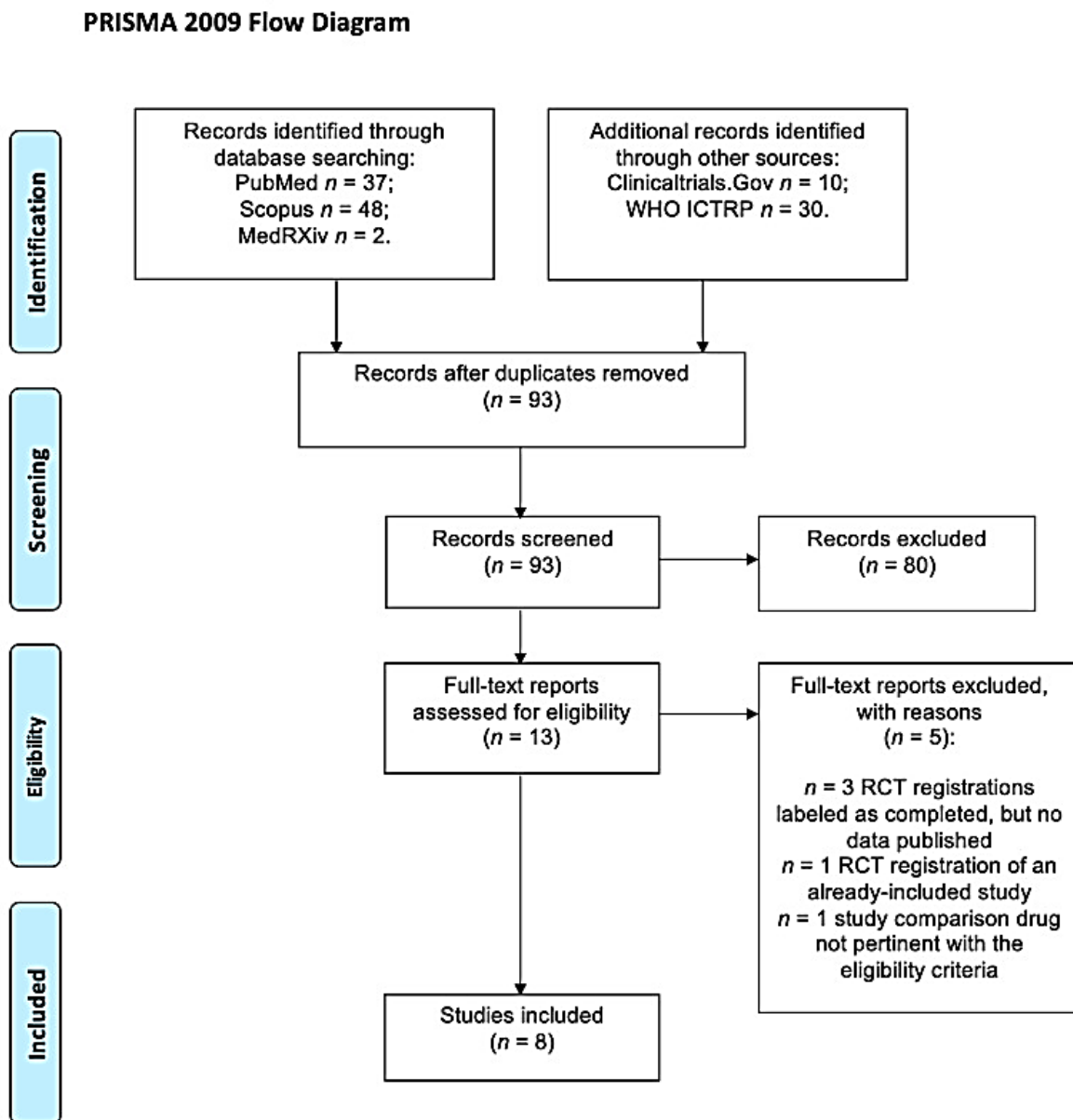


Рисунок 1.1.2. Блок-схема PRISMA, що описує процес відбору для включених досліджень.

1.2. Біологічна активність

Тіоколхікозид широко використовується для лікування опорно-рухового болю протягом десятиліть, але не було опубліковано жодного метааналізу його ефективності. Вдалося знайти лише вісім РКД, сім з яких зосереджувалися лише на болю в попереку. Всі доступні дослідження були оцінені як такі, що мають високий ризик систематичної помилки через неадекватне або недостатнє повідомлення. Хоча пероральне або внутрішньом'язове введення тіоколхікозиду змогло зменшити біль у попереку, у більшості аналізів, клінічний вплив був дуже невеликим. Об'єднана оцінка ефекту завжди була нижчою за мінімально важливу різницю зниження на 1 бал за шкалою VAS від 0 до 10.

Висновки підкреслили необхідність поглибленого аналізу балансу ризику та користі тіоколхікозиду, оскільки з'являлися потенційно шкідливі побічні ефекти [21-24].

Окрім потенційної епілептогенної та гепатотоксичної активності, розслідування ЕМА винесло деякі запобіжні обмеження щодо застосування препарату під час вагітності - ризик тератогенності та ембріональної та фетальної токсичності, рекомендувало загальну тривалість лікування максимум 5 або 7 днів для внутрішньом'язового або перорального введення. Повідомляло, що заходи мінімізації ризиків, запроваджені ЕМА вплинули на практику призначення препаратів поза затвердженими показаннями серед європейських лікарів. Загальне схвалене використання тіоколхікозиду залишалося високим. Препарати, що містять тіоколхікозид, посідали 18-е місце серед найбільш продаваних рецептурних препаратів класу С в Італії у 2022 році.

Результати узгоджуються із загальною низькою ефективністю методів лікування болю в попереку. Існує кілька фармакологічних альтернатив з

вищою достовірністю доказів [24-26]. Повідомлялося про ефективність використання як місцевих і системних нестероїдних протизапальних препаратів у полегшенні опорно-рухового болю. Група членів комітету ЕМА підписала суперечливу заяву, що до появи подальших звітів про безпеку використання тіоколхікозиду не виправдане, оскільки доступні варіанти без генотоксичних ефектів.

Дослідження пропонує систематичну оцінку ефективності тіоколхікозиду, додаючи кількісні параметри щодо поширеності, надійності та клінічного впливу існуючих доказів. Ефективність тіоколхікозиду виявилася клінічно незначною, з низьким рівнем достовірності доказів.

Результати підкреслюють необхідність подальших досліджень, можуть дозволити медичним працівникам приймати більш обґрунтовані рішення щодо використання цього препарату. Дослідження має деякі обмеження, які необхідно враховувати при інтерпретації результатів.

По-перше, критерії включення включали рандомізовані контрольовані дослідження (РКД), залишаючи поза увагою інші потенційні нерандомізовані дослідження. Добре відомо, що відсутність рандомізації при розподілі груп може призвести до упереджених результатів, при оцінці знеболювального ефекту препарату.

По-друге, переважна більшість досліджень базувалися на учасниках з болем у попереку. Узагальнення інтерпретації результатів може бути значущим для гострих ідіопатичних алгічних станів хребта. Пацієнти з болем у попереку можуть відрізнятися від пацієнтів з іншими захворюваннями опорно-рухового апарату. Таким чином, ефекти тіоколхікозиду в інших популяціях можуть відрізнятися.

По-третє, у метааналізів було виявлено суттєву гетерогенність, яка, може відображати відмінності між дослідженнями щодо шляхів введення,

тривалості лікування, якості даних. Всі включені дослідження характеризувалися низькою методологічною якістю та якістю звітності, з високим ризиком упередженості відбору та демаскування. Це можливо, спричинило зсув оцінок ефекту на користь втручання, із загальною низькою достовірністю ефекту.

Пероральне або внутрішньом'язове введення тіоколікозиду призвело до статистично значущого зменшення болю в попереку, але клінічне значення було незначним. Об'єднані оцінки ефекту були нижчими за мінімально важливу різницю зниження на 1 бал за шкалою VAS від 0 до 10.

Загальна кількість літератури була обмеженою, і включені дослідження мали високий ризик систематичної помилки з потенційним зміщенням об'єднаних оцінок у бік сприятливого розміру ефекту.

Подальші високоякісні дослідження можуть прояснити роль тіоколікозиду в лікуванні опорно-рухового болю. Оскільки протягом багатьох років з'являлися потенційно шкідливі побічні ефекти, необхідний поглиблений аналіз ризику та користі тіоколікозиду [18-24].

Тіоколікозид – це похідна колхіцину та напівсинтетична похідна природного колхікозиду (насіння *Gloriosa superba* (Liliaceae)). Ця лікарська рослина здавна використовується як традиційна лікарська трава для лікування різних захворювань в Африці та Південно-Східній Азії.

Бульбчасте коріння використовується для лікування укусів змій, шкірних захворювань та виразок, для лікування запалення. Насіння використовується для полегшення ревматичних та м'язових болів.

У клінічній практиці його використовують як міорелаксant центральної дії. Він має протизапальну та знеболювальну дію. Перша лікарська форма, що містить тіоколікозид, була схвалена в Індії у 2008 році. Будучи менш седативним, тіоколікозид зазвичай використовується для лікування

симптоматичних спазмів, контрактур при м'язових, ревматичних та неврологічних розладах.

Нещодавнє попередження Європейського агентства з лікарських засобів щодо потенційної анеуплоїдії обмежує застосування тіоколхікозиду. Механізм дії Тіоколхікозид демонструє селективну спорідненість до інгібіторних рецепторів гамма-аміномасляної кислоти, гліцинергічних рецепторів.

Він має агоністичну дію на спинально-стрихнінчутливі рецептори. Експериментальні та клінічні дані переконливо свідчать про проконвульсивну дію тіоколхікозиду. Взаємодія з гліциновими рецепторами не пояснює судомної дії молекули. Тіоколхікозид може переважно взаємодіяти з кортикальним підтипом рецептора гамма-аміномасляної кислоти типу А (ГАМК). Він експресує сайти зв'язування з низькою спорідненістю для ГАМК. Сайт розпізнавання з низькою спорідненістю є сайтом зв'язування антагоніста.

Це пояснює просудомний ефект тіоколхікозиду. Раніше припускали міметичний ефект ГАМК, що пояснює його міорелаксantну властивість. Рецептори ГАМКВ значною мірою не зазнають впливу тіоколхікозиду та не сприяють його міорелаксantній дії (рис. 1.2.1).

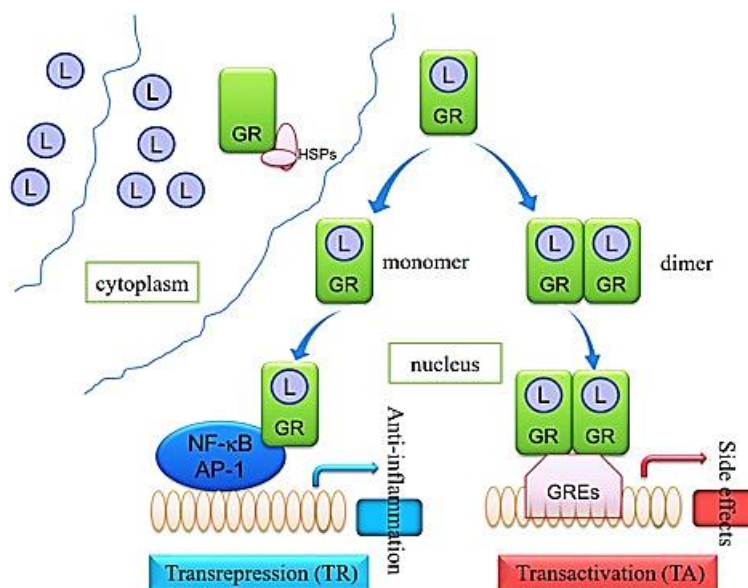


Рисунок 1.2.1. Механізм дії Тіоколхікозиду.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ГЛІКОЗИДІВ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості

Точний механізм м'язової релаксації не відомий. Згідно з наявними даними, пригнічення гліцинових рецепторів є можливим механізмом.

Міорелаксанти центральної дії використовувалися для лікування болісних м'язових спазмів, пов'язаних з локальною травмою тканин або розтягненням м'язів, неврологічними розладами - розсіяний склероз. Тіоколхікозид показаний для симптоматичного лікування болісних м'язових спазмів. Комітет з лікарських засобів для людини Європейського агентства з лікарських засобів рекомендував обмежити дозволене використання лікарських засобів тіоколхікозиду для перорального застосування або ін'єкцій [6].

Тіоколхікозид рекомендуються як додаткове лікування болісних м'язових контрактур, що виникають внаслідок захворювань хребта у дорослих та підлітків. Дозу тіоколхікозиду для перорального застосування або ін'єкцій слід обмежити. Ефективність тіоколхікозиду порівняно з тизанідином оцінена в рандомізованому дослідженні за участю 60 індійських пацієнтів з клінічним діагнозом м'язового спазму [10]. Біль оцінювали за допомогою оцінки рухливості, оцінки м'язового спазму. Обидві групи показали стійке полегшення симптомів. Група тіоколхікозиду продемонструвала кращі показники протягом семиденного періоду лікування. Два багатоцентрові рандомізовані плацебо-контрольовані дослідження оцінили та підтвердили ефективність і безпеку тіоколхікозиду [11, 12].

Нове застосування тіоколхікозиду полягає в лікуванні втрати кісткової маси. Тіоколхікозид пригнічує остеокластогенез, індукований лігандом

рецептора активатора ядерного фактора каппа-В, клітинами раку молочної залози, множинної мієломи шляхом пригнічення запальних шляхів.

Результати всіх досліджень слід інтерпретувати з урахуванням сучасних знань про можливі проблеми безпеки. У багатоцентровому рандомізованому клінічному дослідженні тіоколікозид пов'язаний з більшою кількістю побічних ефектів порівняно з толперизоном [18].

Побічні ефекти включали вільні рухи, запаморочення, нудоту, висип. Побічні ефекти були легкої інтенсивності, зникали без втручання. Тіоколікозид може спричиняти гепатотоксичність [5]. Відомо про судоми, пов'язані із застосуванням тіоколікозиду [8].

Експериментальні докази антагоністичної дії препарату на рецептори ГАМКА можуть пояснити клінічні дані. Тіоколікозид може провокувати судоми у схильних пацієнтів. Його слід уникати пацієнтам з низьким порогом судом або порушенням гематоенцефалічного бар'єру [19].

Тіоколікозид виявився таким же ефективним, як і тизанідин. Він позбавлений будь-якого седативного ефекту. Психомоторні показники оцінювалися за допомогою шкали VAS. Це включало втому, сонливість, запаморочення, пильність, за допомогою психометричних тестів. Анеуплоїдія – це хромосомна аномалія, при якій організм має кількість хромосом більше або менше, ніж у дикого типу. Вона ініціює онкогенез [22]. M2 або SL59.0955, метаболіт тіоколікозиду. Він має потенціал пошкоджувати клітини, що діляться, та спричиняти анеуплоїдію. Після перорального застосування метаболіт M1 виводиться з уявним $t_{1/2}$ від 3,2 до 7 годин. Метаболіт M2 має $t_{1/2}$ у середньому 0,8 години [24].

Структури колхіцину, люміколіцину, ізоколіцину, колхіцеїну, ізоколіцеїну та тіоколіцину представлено на рисунку 2.1.1.

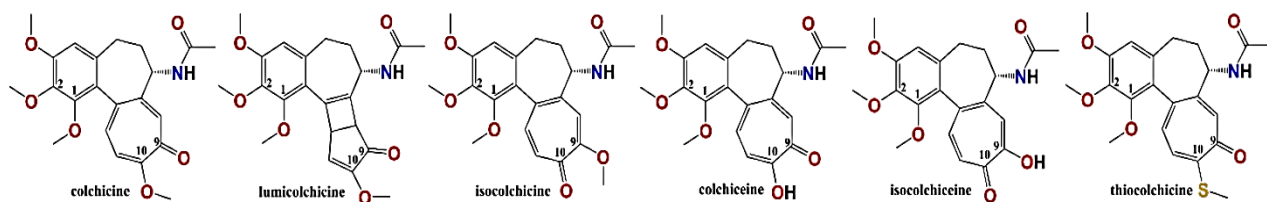


Рисунок 2.1.1. Структури колхіцину та його аналогів.

Колхіцеїн – це C10-деметильований аналог колхіцину, що характеризується значно нижчою токсичністю. Він є основним продуктом деградації колхіцину, може природним чином зустрічатися в рослинних екстрактах разом з колхіцином. Колхіцеїн (його C10-ацильований аналог) може існувати у двох таутомерних формах. Ізоформа є дещо домінантнішою. Заміна C10-метоксигрупи на тіометил в аналогу колхіцину тіоколхіцині зменшує ізомеризацію. Тіоколхіцин є більш стабільним, проявляє нижчу токсичність, має вищу спорідненість до зв'язування з тубуліном. Схильність колхіцеїну до таутомеризації в поєднанні з втратою C10-метоксигрупи є причиною слабкої антимітотичної активності. Колхіцеїн демонструє кращу бактеріостатичну та протигрибкову активність, ніж колхіцин.

У межах цих аналогів представлено 5 нових естерів (2b–c та 4b–d) та 4 нових карбонати (2e–f та 4e–f). Шляхи синтезу представлено на рисунку 2.1.2.

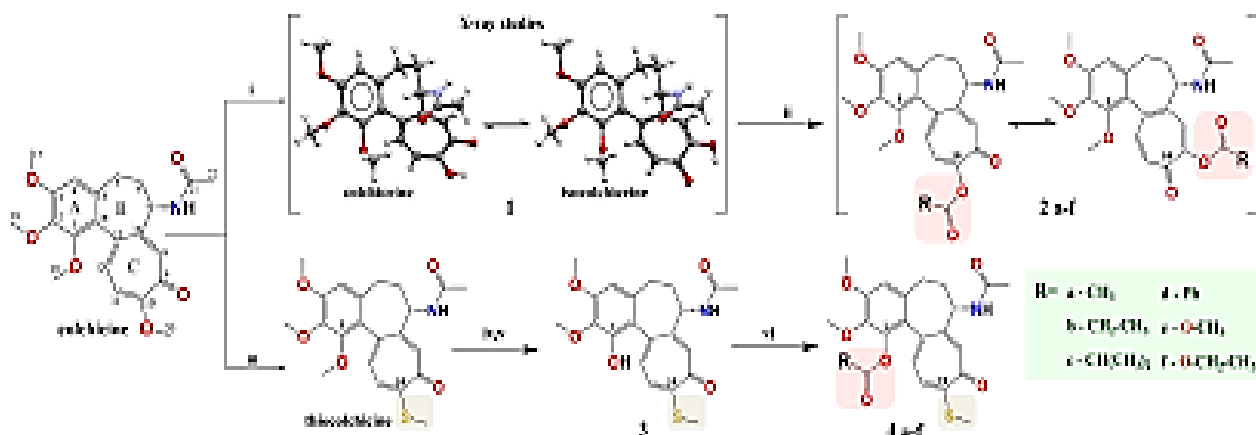


Рисунок 2.1.2. Синтез нових аналогів колхіцину. Реагенти та умови: (i) крижана оцтова кислота, хлоридна кислота, 100 °C, 6 год; MeOH/H₂O, CH₃SNa, кімнатна температура, 24 год; DCM, ацетилхлорид, SnCl₄, 0 °C → кімнатна температура, 48 год; MeOH/H₂O, LiOH, кімнатна температура.

Проведений рентгеноструктурний аналіз показав, що вони є напівгідратом колхіцеїну, в якому елементарна комірка містить дві таутомерні форми: колхіцеїн та ізоколхіцеїн.

Колхіцин обробляли метантиолатом натрію для отримання тіоколхіцину.

Використовуючи модифікований метод Бладе-Фоном тіоколхіцин був регіоселективно деметильований за метоксигрупою C1. Це призвело до отримання 1-деметилтіоколхіцину з виходом 40%.

Регіоселективне деметилування було підтверджено рентгеноструктурним аналізом. Сполуки були оброблені ацилхлоридами або хлорформіатами, що дало одинарно модифіковані похідні та подвійно модифіковані похідні (рис. 2.1.3).

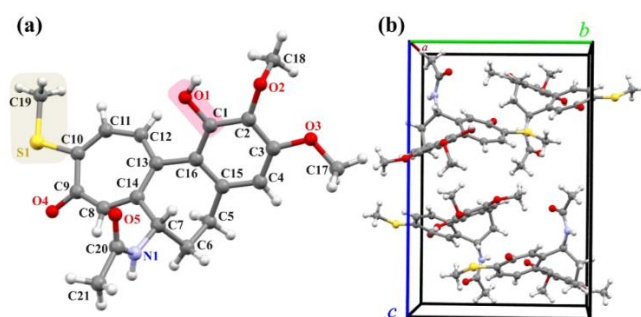


Рисунок 2.1.3. Молекула 1-деметилтіоколхіцину та її кристалічна структура у проєкції вздовж напрямку кристала.

Чистоту та структуру синтезованих похідних колхіцину визначено на основі ESI-MS, ЯМР та рентгеноструктурного аналізу. Зникнення сигналу

приблизно при 56,5 ppm у спектрі ^{13}C ЯМР колхіцину свідчить про утворення колхіцеїну. Проведені синтези дозволили отримати сполуки з менш ліпофільними характеристиками, ніж у колхіцину зі значеннями clogP 0,83, 060 та 0,95 (рис. 2.1.4, 2.1.5).

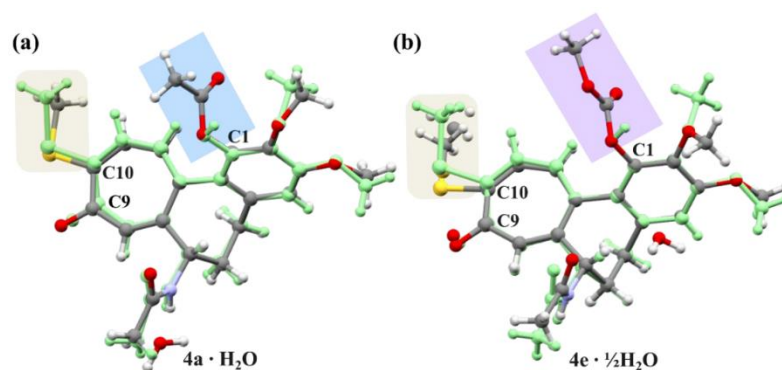


Рисунок 2.1.4. Порівняння молекулярної конформації, отриманої за даними рентгеноструктурного аналізу.

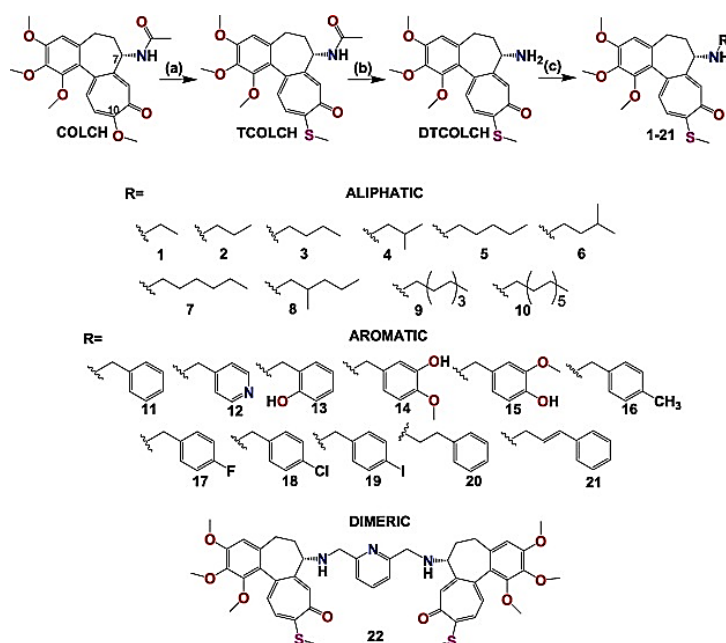


Рисунок 2.1.5. Синтез аміноаналогів тіоколхіцину, модифікованих у положенні C7 за допомогою реакції відновного амінування.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

За Європейською Фармакопеею аналізують Тіоколхікозид у двох формах:

1. Тіоколхікозид, кристалізований з етанолу. Монографія 04/2016:2896 виправлено 10.0.
2. Тіоколхікозиду гідрат. Монографія 04/2016:2814 corrected 10.1.

Вміст АФІ в Тіоколхікозиду кристалізованому: від 97,0% до 102,0%. Містить змінну кількість етанолу.

Вміст АФІ в Тіоколхікозиду гідраті: від 96,0% до 102,0%. Містить змінну кількість води.

Споріднені речовини. Методом Рідинна хроматографія (2.2.29). Випробовуваний розчин (а). 20,0 мг випробовуваної речовини в метанолі Р та доведіть об'єм до 20,0 мл тим самим розчинником.

Випробовуваний розчин (b). 1,0 мл випробовуваного розчину (а) до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин порівняння (а). 1,0 мл випробовуваного розчину (а) до 100,0 мл метанолом Р. 2,0 мл цього розчину до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин порівняння (b). 5 мг тіоколхікозиду для перевірки придатності системи CRS (містить домішки D, E, G, H, K та L) у метанолі R.

Розчин порівняння (с). 20.0 мг тіоколхікозиду гідрату CRS у метанолі R та доведіть об'єм розчину до 20.0 мл.

Рухома фаза: – *рухома фаза А:* 0.22 г форміату амонію R у 350 мл води для хроматографії R та 25 мл тетрагідрофурану R;

– *рухома фаза В:* 45 мкл безводної мурашиної кислоти R у 900 мл ацетонітрилу R та 100 мл тетрагідрофурану R;

Виявлення: спектрофотометр при 370 нм.

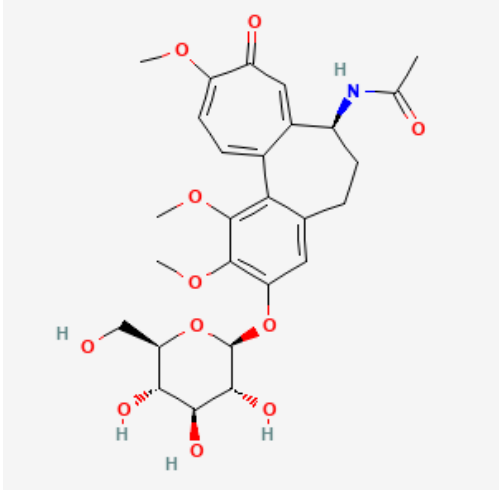
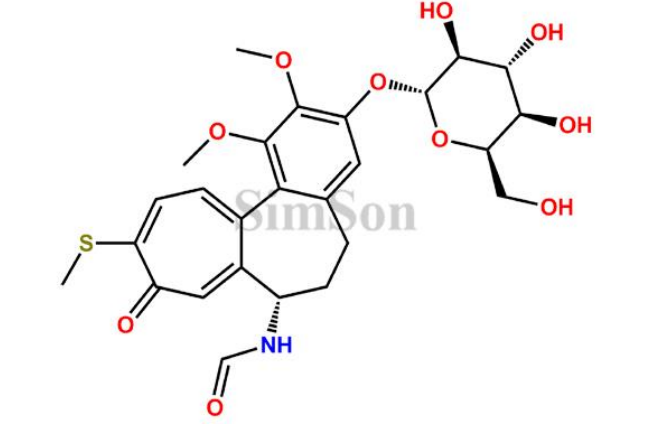
Специфіковані домішки: D, E, H.

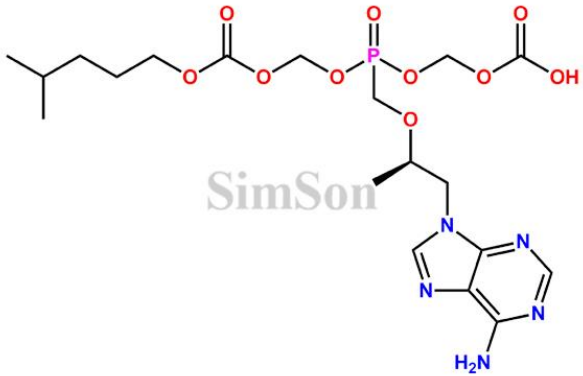
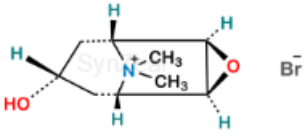
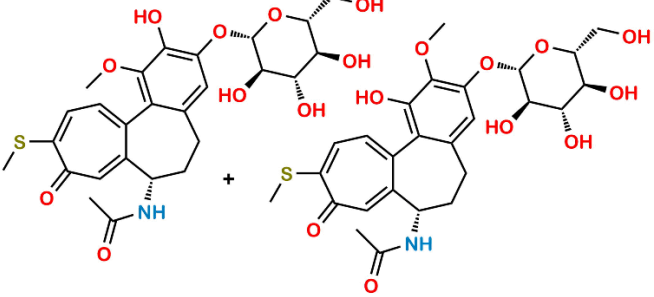
Інші домішки - Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування): A, B, C, G, J, K, L.

Для Тіоколхікозиду гідрату: специфіковані домішки: D, E, G, H, K.

Інші виявлені домішки - Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування): A, B, C, J, L.

Таблиця 3.1. Специфіковані домішки: D, E, H.

	D. N-[(7S,12aRa)-3-(β-D-глюкопіранозилокси)-1,2,10-триметокси-9-оксо-5,6,7,9-тетрагідробензо[а]гептален-7-іл]ацетамід (колхікозид)
	E. N-[(7S,12aRa)-3-(β-D-глюкопіранозилокси)-1,2-диметокси-10-(метилсульфаніл)-9-оксо-5,6,7,9-тетрагідробензо[а]гептален-7-іл]формамід (N-деацетил-N-формілтіоколхікозид)

	Н. N-[(7S,12aRa)-3-(β-D-глюкопіранозилокси)-1,2-диметокси-9-оксо-5,6,7,9-тетрагідробензо[а]гептален-7-іл]ацетамід (10-деметоксиколхікозид)
	Г. (7S,12aRa)-7-аміно-3(β-D-глюкопіранозилокси)-1,2-диметокси-10-(метилсульфаніл)-6,7-дигідробензо[а]гептален-9(5H)-он (N-деацетилтіоколхікозид)
	К. N-[(7S,12aRa)-3-(β-D-глюкопіранозилокси)-2-гідрокси-1-метокси-10-(метилсульфаніл)-9-оксо-5,6,7,9-тетрагідробензо[а]гептален-7-іл]ацетамід
<i>Неспецифіковані домішки:</i>	
А. N-[(7S,12aRa)-1,2,3,10-тетраметокси-9-оксо-5,6,7,9-тетрагідробензо[а]гептален-7-іл]ацетамід (колхіцин) В. N-[(7S,12aRa)-1,2,3-триметокси-10-(метилсульфаніл)-9-оксо-5,6,7,9-тетрагідробензо[а]гептален-7-іл]ацетамід (тіоколхіцин) С.	

N-[(7S,12aRa)-3-гідрокси-1,2-диметокси-10-(метилсульфаніл)-9-оксо-5,6,7,9-тетрагідробензо[а]гептален-7-іл]ацетамід (3-О-деметилтіоколхіцин)
J.

N-[(7S,12aRa)-3-(β-D-глюкопіранозилокси)-1,2-диметокси-10-(метилсульфініл)-9-оксо-5,6,7,9-тетрагідробензо[а]гептален-7-іл]ацетамід (тіоколхікозид S-оксид)
L.

N-[(7S,12aSa)-3-(β-D-глюкопіранозилокси)-1,2-диметокси-10-(метилсульфаніл)-9-оксо-5,6,7,9-тетрагідробензо[а]гептален-7-іл]ацетамід (12aSa-тіоколхікозид)

Нами виконано хроматографічне дослідження методом ВЕРХ для ідентифікації та визначення чистоти випробовуваної субстанції тіоколхікозиду на вміст супровідних речовин, адаптація умов хроматографування випробовуваної субстанції з використанням базових умов хроматографування і методик дослідження, які описано в Європейській Фармакопеї для дослідження методом Рідинної хроматографії.

Дослідження включає два напрямки:

- 1). Дослідження кількісного вмісту АФІ та супровідних речовин.
- 2). Визначення супровідних речовин (чистоти субстанції).

Матеріали та методи.

Рідинний хроматограф Dionex Ultimate 3000 з діодно-матричним детектором.

Колонка Acquity UPLC BEH Phenyl: розмір l = 0,10 м, Ø = 2,1 мм; стаціонарна фаза — енд-кепована етилен-мосткова фенілсіліл-силікагель для хроматографії (гібридний матеріал) R (1,7 мкм).

Хроматографічні умови

- Температура колонки: 25 °C.
- Швидкість потоку: 0,4 мл/хв.
- Детекція: спектрофотометр при 370 нм.
- Об'єм ін'єкції: 1,0 мкл тестового розчину (а) та референсних (а), (б).

Рухома фаза А: розчинити 0,22 г амонію формату R у 350 мл води для хроматографії R, додати 25 мл тетрагідрофурану R.

Рухома фаза В: розвести 45 мкл безводної мурашиної кислоти R у 900 мл ацетонітрилу R, додати 100 мл тетрагідрофурану R.

Градiєнтна елюція:

Час (хв)	А (% об/об)	В (% об/об)
0–2	99	1
2–6	99 → 92	1 → 8
6–7,5	92 → 70	8 → 30
7,5–8,8	70 → 50	30 → 50
8,8–9,2	50 → 2	50 → 98
9,2–10	2	98

Концентрації розчинів

- **Тестовий розчин (а) (для супровідних домішок):** розчинити 20,0 мг субстанції в метанолі R і довести до 20,0 мл тим самим розчинником → *концентрація = 1,0 мг/мл.*
- **Тестовий розчин (б) (для кількісних досліджень):** розвести 1,0 мл розчину (а) до 10,0 мл метанолом R → *0,1 мг/мл.*
- **Референсний розчин (а) (для супровідних домішок):** розвести 1,0 мл розчину (а) до 100,0 мл метанолом R, потім 2,0 мл цього розчину до 10,0 мл метанолом R → загальне розведення 1:500 → *концентрація = 2 мкг/мл (0,2 % від тестової).*

- **Референсний розчин (с) (для кількісних досліджень):** розчинити 20,0 мг thiocolchicoside hydrate CRS в метанолі R і довести до 20,0 мл, потім 1,0 мл до 10,0 мл $\rightarrow 0,1$ мг/мл.

Ідентифікацію сполук проводили за часом утримування з порівнянням до стандартів. Обчислення концентрацій виконували за площею піків у хроматограмах. При проведенні комп'ютерного аналізу використовували програму OpenLab CDS.

Для проведення досліджень методом ВЕРХ використовували реактиви:

вода (чистоти для ВЕРХ),

амонію форміат (чистоти для ВЕРХ),

ТГФ (чистоти для ВЕРХ),

кислота мурашина (чистоти для ВЕРХ),

ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ).

Отримані результати.

На рисунках 3.1-3.6 представлено отримані хроматограми.

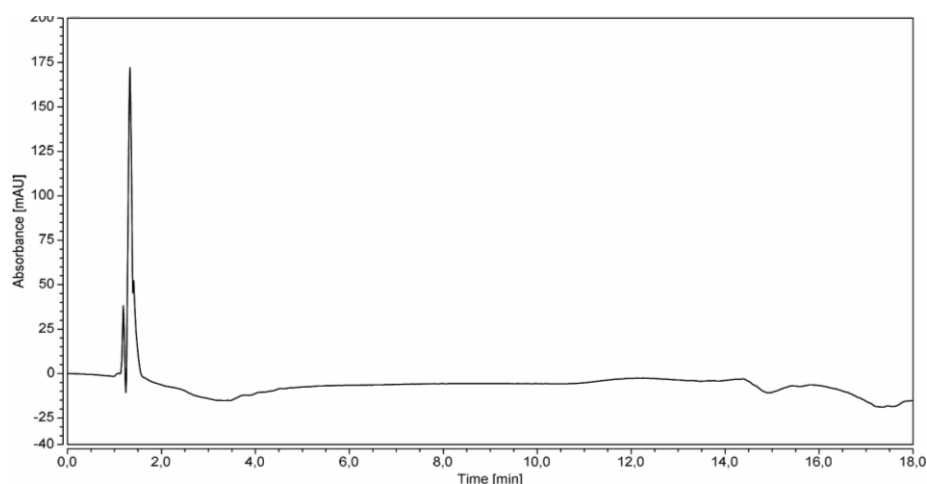


Рисунок 3.1. Хроматограма бланку.

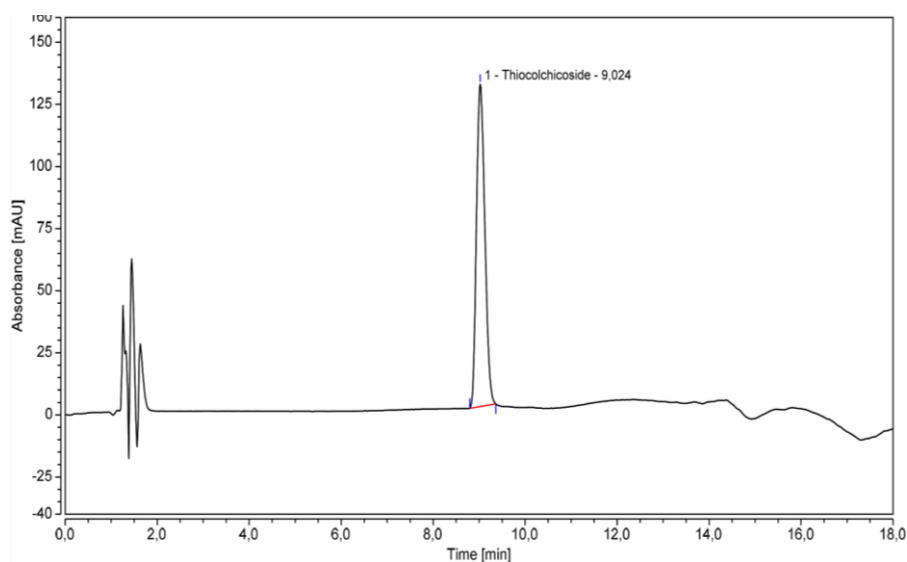


Рисунок 3.2. Хроматограма розчину стандартних зразків (кількісне визначення).

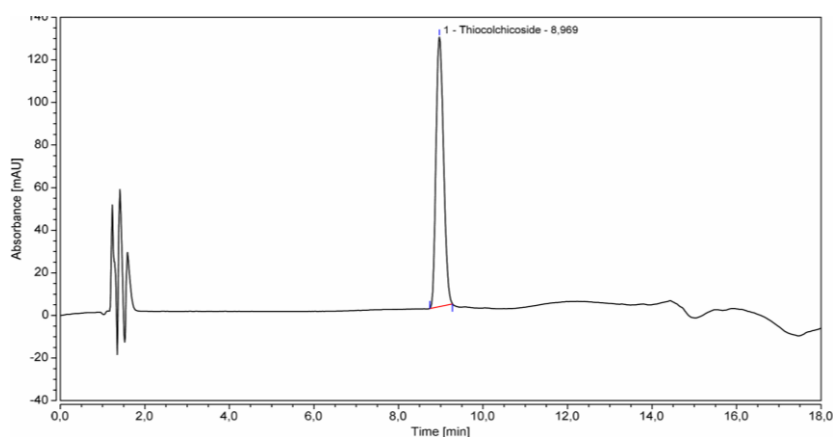


Рисунок 3.3. Хроматограма розчину випробовуваного зразку субстанції: *Тіоколхікозид* $R_t=8.969$ хв (кількісне визначення).

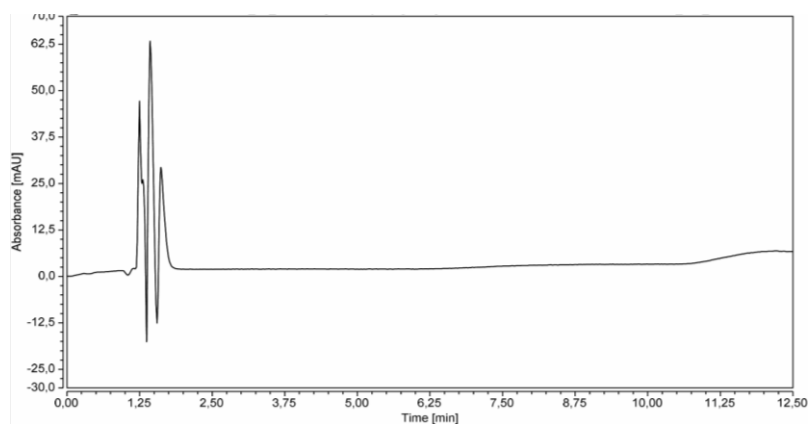


Рисунок 3.4. Хроматограма бланку.

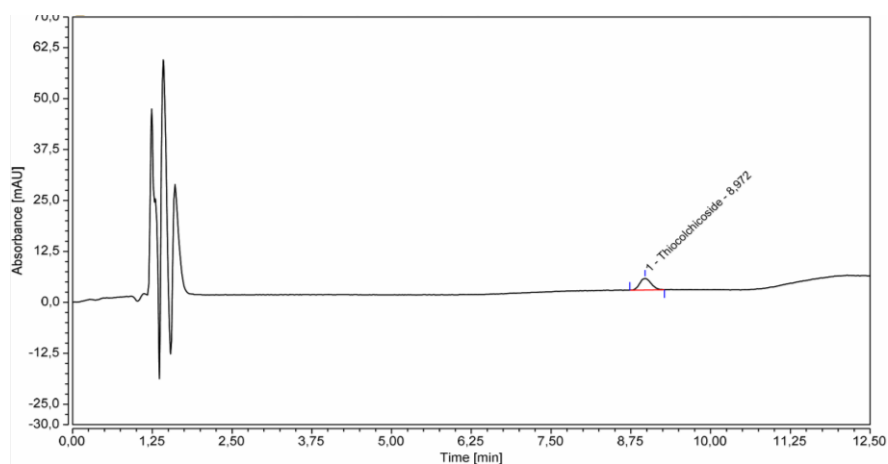


Рисунок 3.5. Хроматограма розчину стандартних зразків (супровідні речовини).

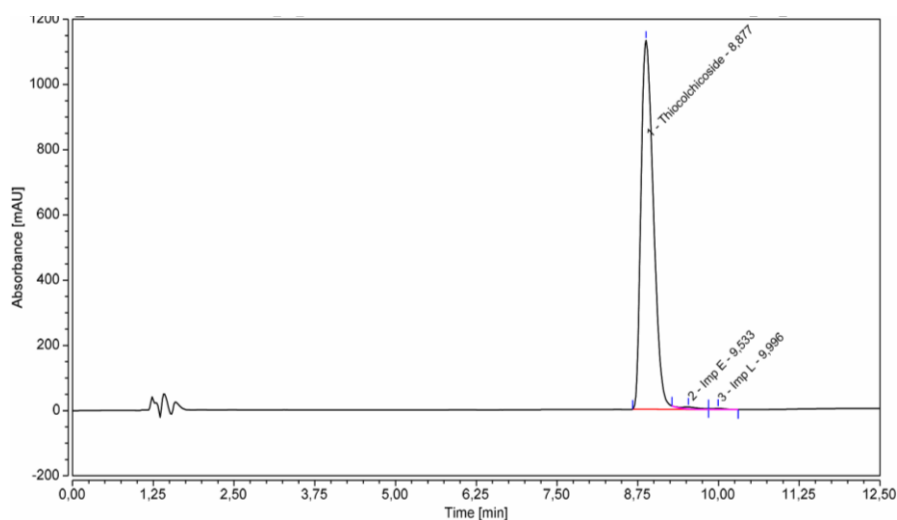


Рисунок 3.6. Хроматограма розчину випробовуваного зразку субстанції: *Тіоколхікозид* $R_t=8.877$ хв та домішок Е $R_t=9.533$ хв та L $R_t=9.996$ хв (супровідні речовини).

Отримані результати представлено в таблицях 3.2, 3.3:

Таблиця 3.2. Кількісне визначення.

	<i>Стандарт</i>			
	мг			
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i> (≤ 2.0)	<i>N</i> (≥ 2000)
	9,024	27,349	1,2	11170
	8,943	27,172	1,2	11006
	8,981	27,012	1,3	11297
	8,904	27,141	1,2	10955

	9,023	27,310	1,2	10603
	9,004	27,170	1,2	10895
Середнє	8,980	27,192	1,2	10988
SD	0	0		
RSD	0,53%	0,50%		

	<i>Тест</i>	
	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	8,916	26,903
	8,922	26,287
	8,947	26,320
	8,886	26,734
	8,896	26,664
	8,883	26,635
Середнє	8,908	26,590

Таблиця 3.3. Супровідні речовини.

	<i>Стандарт</i>			
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i>	<i>N</i>
	8,972	0,599	1,2	11675
	8,935	0,587	1,2	11847
	8,860	0,597	1,4	11534
Середнє	8,922	0,594	1,2	11685
SD	0	0		
RSD	0,64%	1,03%		

	<i>Тест</i>			
	<i>Тіоколхикозид</i>		<i>Imp E</i>	
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	8,877	254,166	9,533	0,394

	8,857	268,985	9,528	0,413
	8,845	271,101	9,506	0,414
Середнє	8,860	264,751	9,522	0,407

В таблицях:

T- тейлінг (форма піку, часто буває менше 2),

N – кількість теоретичних тарілок (чим більше теоретичних тарілок, тим вища ефективність розділення компонентів у колонці),

RSD - відносне стандартне відхилення, згідно Фармакопеї, має бути менше 2),

SD –стандартне відхилення, використовується для визначення RSD)

1). Встановлено, що значення кількісного вмісту знаходяться відповідно до регламентованих вимог.

2). Супровідні речовини не виходять за межі.

Вміст тіоколіхікозиду розраховувався за наступною формулою:

$$A = \frac{A_t \times C_r \times P}{A_r \times C_t}$$

де:

- A_t – середня площа піку тіоколіхікозиду на хроматограмі випробуваного розчину (26,590);
- A_r – середня площа піку тіоколіхікозиду на хроматограмі стандартного розчину(27,192);
- C_r – концентрація стандарту (0,1 мг/мл – залежить від точності наважки)
- C_t – концентрація в тесту (0,1 мг/мл – залежить від точності наважки)
- $P(\%)$ – вміст основної речовини в стандартному зразку тіоколіхікозиду, (98,7)%

$A(\%) = 96,51$ (має знаходитися в межах від 95% до 105%)

$$A = \frac{26,590 \times 0,1 \times 98,7}{27,192 \times 0,1}$$

Супровідні домішки:

Розрахунок відсоткового вмісту:

Корекційні фактори: помножити площі піків таких домішок на відповідний фактор: домішка D = 1,7; домішка H = 2,8 (якщо вони виявлені).

Для кожної домішки використовувати концентрацію тіоколіхікозиду гідрату в еталонному розчині (a).

Граничні значення:

Домішка E: максимум 1,0 %.

Домішка H: максимум 0,7 %.

Домішка K: максимум 0,3 %.

Домішки D, G: для кожної — максимум 0,2 %.

Неспецифіковані домішки: для кожної — максимум 0,10 %.

Загальний вміст: максимум 2,5 %.

В результаті проведених досліджень встановлено, що в наданій на дослідження субстанції виявлено супровідну домішку E, вміст якої становить **0,14% (при допустимих межах 1%)**

(розрахунок проводився наступним чином: площа стандарту для супровідних домішок – 0,2%, відносно цієї цифри методом хреста розраховували % вміст супровідної домішки)

ВИСНОВКИ

1. Впроваджено метод ВЕРХ у аналіз субстанції Тіоколхікозиду (АФІ) та ідентифіковано АФІ і супровідні речовини – специфіковану домішку Е (N-деацетил-N-формілтіоколхікозид) $R_t=9.533$ хв, неспецифіковану домішку L (12aSa-тіоколхікозид) $R_t=9.996$ хв, не виявлено продукт хімічної деградації тіоколхікоиду (також, його метаболіт) М2 (3-деметилтіоколхіцин)- геномотоксичну сполуку та отруту.
2. Визначено чистоту досліджуваної субстанції АФІ Тіоколхікозиду та виявлено супровідні речовини з використанням тестового розчину з *концентрацією* $= 1,0$ мг/мл та референсного розчину з *концентрацією* 2 мкг/мл ($0,2$ % від тестової).
3. Визначено кількісний вміст АФІ $96,51\%$ (за Євр. Фарм. $95,0\%$ до $105,0\%$), специфіковану домішку Е - вміст становить $0,14\%$ (при допустимих межах 1%); вміст неспецифікованої домішки L (12aSa-тіоколхікозид) не розраховувався, оскільки її хроматографічні характеристики вказують на слідові кількості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 1.PubChem National Institutes of Health. Thiocolchicoside. [(accessed on 19 July 2024)];
Available
online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiocolchicoside>.
2. European Medicines Agency Thiocolchicoside-containing medicines—Referral. [(accessed on 19 July 2024)]. Available
online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/thiocolchicoside-containing-medicines#key-facts>.
3. Thiocolchicoside: Review of adverse effects. *Prescrire Int.* 2016;25:41–43.
4. Agenzia Italiana del Farmaco Nota Informativa Importante su Medicinali Contenenti Tiocolchicoside. [(accessed on 19 July 2024)];
Available online: <https://www.aifa.gov.it/-/nota-informativa-importante-su-medicinali-contenenti-tiocolchicoside>.
5. Druet-Cabanac A., Sophie J.L., Afshari R., Sahnoun R., Kouao-Kanga G., Toussi M., Granados D. A drug utilization study of thiocolchicoside-containing medicinal products for systemic use in France and Italy: A cross-sectional electronic medical records database study. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 2023;32:1093–1102. doi: 10.1002/pds.5611.
6. Iliopoulos K., Koufaki P., Tsilikas S., Avramidis K., Tsagkalis A., Mavragani C., Zintzaras E. A randomized controlled trial evaluating the short-term efficacy of a single-administration intramuscular injection with the fixed combination of thiocolchicoside-diclofenac versus diclofenac monotherapy in patients with acute moderate-to-severe low back pain. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2023;24:476. doi: 10.1186/s12891-023-06599-0.
7. Zeng L., Brignardello-Petersen R., Hultcrantz M., Mustafa R.A., Murad M.H., Iorio A., Traversy G., Akl E.A., Mayer M., Schunemann H.J., et al. GRADE Guidance 34: Update on rating imprecision using a minimally

- contextualized approach. *J. Clin. Epidemiol.* 2022;150:216–224. doi: 10.1016/j.jclinepi.2022.07.014.
8. Page M.J., McKenzie J.E., Bossuyt P.M., Boutron I., Hoffmann T.C., Mulrow C.D., Shamseer L., Tetzlaff J.M., Akl E.A., Brennan S.E., et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372:n71.doi: 10.1136/bmj.n71.
 9. Bozada T., Jr., Borden J., Workman J., Del Cid M., Malinowski J., Luechtefeld T. Sysrev: A FAIR Platform for Data Curation and Systematic Evidence Review. *Front. Artif. Intell.* 2021;4:685298.doi: 10.3389/frai.2021.685298.
 10. Sterne J.A.C., Savovic J., Page M.J., Elbers R.G., Blencowe N.S., Boutron I., Cates C.J., Cheng H.Y., Corbett M.S., Eldridge S.M., et al. RoB 2: A revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ.* 2019;366:l4898. doi: 10.1136/bmj.l4898.
 11. Higgins J.P.T., Thomas J., Chandler J., Cumpston M., Li T., Page M.J., Welch V.A. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. 2nd ed. John Wiley & Sons; Chichester, UK: 2019.
 12. Farrah K., Young K., Tunis M.C., Zhao L. Risk of bias tools in systematic reviews of health interventions: An analysis of PROSPERO-registered protocols. *Syst. Rev.* 2019;8:280. doi: 10.1186/s13643-019-1172-8.
 13. Wang Y., Ghadimi M., Wang Q., Hou L., Zeraatkar D., Iqbal A., Ho C., Yao L., Hu M., Ye Z., et al. Instruments assessing risk of bias of randomized trials frequently included items that are not addressing risk of bias issues. *J. Clin. Epidemiol.* 2022;152:218–225. doi: 10.1016/j.jclinepi.2022.10.018.
 14. HersHKovich O., Grevitt M.P., Lotan R. Schober Test and Its Modifications Revisited-What Are We Actually Measuring? Computerized Tomography-Based Analysis. *J. Clin. Med.* 2022;11:6895. doi: 10.3390/jcm11236895.
 15. The Cochrane Collaboration . Review Manager (RevMan), Version 5.4. The Cochrane Collaboration; London, UK: 2020.

16. Guyatt G., Zhao Y., Mayer M., Briel M., Mustafa R., Izcovich A., Hultcrantz M., Iorio A., Alba A.C., Foroutan F., et al. GRADE guidance 36: Updates to GRADE's approach to addressing inconsistency. *J. Clin. Epidemiol.* 2023;158:70–83. doi: 10.1016/j.jclinepi.2023.03.003.
17. Ketenci A., Sindel D., Tulay Koca T., Yavuz Karahan A., Erdal A., Aydin E., Sarifakioglu B., Ustaomer K., Talay Calis H., Sarikaya S., et al. A multi-center, double-blind, randomized parallel-group Phase IV study comparing the efficacy and safety of thiocolchicoside ointment versus placebo in patients with chronic mechanical low back pain and an acute muscle spasm. *Turk. J. Phys. Med. Rehabil.* 2022;68:456–463. doi: 10.5606/tftrd.2022.9744.
18. Thiocolchicoside Injection and Capsule in Treatment of Acute Low Back Pain. [(accessed on 30 July 2024)]; Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00917436?intr=NCT00917436&rank=1>.
19. An Investigator Initiated Study Comparing Individual Use of Etorocoxib (to Reduce Pain and Swelling) and Thiocolchicoside (a Muscle Relaxant) against Combined Use of Etoroxocib and Thiocolchicoside in Patients with Pain in Different Regions of the Spine Along with Muscle Rigidity and Spams. [(accessed on 30 July 2024)]. Available online: <https://trialsearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=CTRI/2023/08/056416>.
20. A Randomised, Two Arm, Openlabel, Active Controlled, Multicentric Clinical Study to Evaluate the Efficacy and Safety of a Topical Fixed Dose Combination of a Muscle Relaxant Thiocolchicoside and a Non Steroidal Anti-Inflammatory Drug, Diclofenac in Comparison with Diclofenac Topical Gel (1.16% w/w) in Acute Non-Specific Low Back Pain. [(accessed on 30 July 2024)]. Available online: <https://trialsearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=CTRI/2011/11/002116>.

21. The Medicines Utilisation Monitoring Centre National Report on Medicines Use in Italy. Year 2022. [(accessed on 30 July 2024)]; Available online: <https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1967301/Rapporto-OsMed-2022.pdf>.
22. Cashin A.G., Wand B.M., O’Connell N.E., Lee H., Rizzo R.R.N., Bagg M.K., O’Hagan E., Maher C.G., Furlan A.D., van Tulder M.W., et al. Pharmacological treatments for low back pain in adults: An overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2023;4:CD013815.doi: 10.1002/14651858.CD013815.pub2.
23. Ijzelenberg W., Oosterhuis T., Hayden J.A., Koes B.W., van Tulder M.W., Rubinstein S.M., de Zoete A. Exercise therapy for treatment of acute non-specific low back pain. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2023;8:CD009365. doi: 10.1002/14651858.CD009365.pub2.
24. Stepien, Z.; Krasodonski, W. Investigation into Engine Deposit-Forming Tendency due to Sulfate Salt Contamination of Gasoline–Ethanol Blends. *Energy Fuels* 2019, 33, 4244–4253.
25. Lin W, Zhu J, Hayes JE, Richie JP, Jr, Muscat JE. Comparison of carcinogen biomarkers in smokers of menthol and nonmenthol cigarettes: the 2015–2016 national health and nutrition examination survey special sample. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2022;31(8):1539-1545.
26. U.S. Food and Drug Administration. FDA proposes rules prohibiting menthol cigarettes and flavored cigars to prevent youth initiation, significantly reduce tobacco-related disease and death. Published April 28, 2022. Accessed August 10, 2025. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-proposes-rules-prohibiting-menthol-cigarettes-and-flavored-cigars-prevent-youth-initiation>
27. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості

лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів.
2014. Т. 2.

28. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 11-th ed., 2022.
V.1II: 4193-4195.

SUMMARY

"QUANTITATIVE AND DETERMINATION OF THIICOLCHICOSIDE AND ITS ACCOMPANYING SUBSTANCES IN THE COMPOSITION OF THE TEST SUBSTANCE"

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: professor, doctor of pharm. sciences Welchinska O.V.

Keywords: thiocolchicoside, accompanying substances residual amounts, substance, medicinal product, HPLC, impurities.

Introduction. Thiocolchicoside is a centrally acting muscle relaxant. It is used to treat painful muscle spasms caused by spinal injuries, musculoskeletal diseases, and spinal cord pathologies. It affects the central nervous system, reduces muscle tone, and blocks pain signals. European Pharmacopoeia. Thiocolchicoside (current edition 11.0, 2025) under the name Thiocolchicoside crystallised from ethanol. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.): this is the main international standard. Contains the official monographs Thiocolchicoside crystallised from ethanol and Thiocolchicoside hydrate.

Materials and methods. Objects of research are substances of thiocolchicoside and its standard samples. Research subject: development of conditions for HPLC study of pharmaceutical analysis of thiocolchicoside substance. Methods: Dionex Ultimate 3000 liquid chromatograph with diode array detector. Acquity UPLC BEH Phenyl column: size $l = 0.10$ m, $\varnothing = 2.1$ mm; stationary phase — end-capped ethylene-bridged phenylsilyl silica gel for chromatography (hybrid material) R (1.7 μ m). OpenLab CDS program.

Results. Compound identification was performed by retention time with comparison to standards. Concentration calculations were performed by peak area in chromatograms. Computer analysis was performed using the OpenLab CDS program. The HPLC method was introduced into the analysis of the substance Thiocolchicoside (API) and the API and accompanying substances were identified - specified impurity E (N-deacetyl-N-formylthiocolchicoside) $R_t=9.533$ min, unspecified impurity L (12aSa-thiocolchicoside) $R_t=9.996$ min.

Conclusions. The purity of the test substance Thiocolchicoside API was determined and accompanying substances were detected using a test solution with a concentration of $= 1.0$ mg/ml and a reference solution with a concentration of 2μ g/ml (0.2% of the test solution). 3. The quantitative content of API was determined to be 98.7% (according to Eur. Pharm. 96.0% to 102.0%) and accompanying substances (up to 2.5%) using a test solution with a concentration of 0.1 mg/ml and a reference solution with a concentration of 0.1 mg/ml, which meets pharmacopoeial requirements.

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.



СЕРТИФІКАТ

№029/2026

Цим засвідчується, що

Ковальчук О. В.

з постерною доповіддю

брав(-ла) участь у VI Науково-практичній конференції з міжнародною участю

«PLANTA+. НАУКА, ПРАКТИКА ТА ОСВІТА»

23 січня 2026 р.,
м. Київ, Україна



PLANTA+
НАУКА, ПРАКТИКА ТА ОСВІТА

Конференція зареєстрована у ДНУ «Український інститут науково-технічної експертизи та інформації» (Посвідчення УкрІНТЕІ № 341 від 28 жовтня 2025 р.)

Ректор Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця, д. м. н., професор

В. о. завідувача кафедри фармакогнозії та ботаніки,
д. фарм. н., професор



Юрій КУЧИН

Уляна КАРПЮК