





О.В. Шаповалова ✉ 
Н.П. Неугодова 

Определение бета-глюканов и пептидогликанов в лекарственных препаратах

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Шаповалова Ольга Владимировна; shapovalova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Бета-глюканы и пептидогликаны – компоненты клеточных стенок бактерий и грибов, которые могут являться источниками пирогенных загрязнений лекарственных препаратов парентерального применения. Присутствие подобных примесей может приводить к неблагоприятным иммунным реакциям, поэтому контролю присутствия бета-глюканов и пептидогликанов в лекарственных средствах уделяют определенное внимание. Унифицированный подход к обнаружению бета-глюканов и (или) пептидогликанов в фармацевтической отрасли отсутствует; практическое применение имеют несколько методов качественного и количественного определения этих примесей.

ЦЕЛЬ. Оценка практической значимости существующих методов обнаружения бета-глюканов и (или) пептидогликанов в лекарственных препаратах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Исследована возможность применения методов определения бета-глюканов и пептидогликанов с использованием реактива на основе лизата амебоцитов и реактива из плазмы личинок шелкопряда. Содержание бета-глюканов определяли в лекарственном препарате «Бупивакаин», в котором бета-глюканы были обнаружены ранее случайным образом. В испытаниях препарата использовали три типа реактивов на основе лизата амебоцитов разного состава, реагирующих: на бактериальные эндотоксины и бета-глюканы (лизат с факторами С и G); только на бактериальные эндотоксины (лизат с фактором С); только на бета-глюканы (лизат с фактором G). Наличие пептидогликанов оценивали в лекарственном препарате «Икодекстрин» с помощью реактива из плазмы личинок шелкопряда. Качественный анализ выполняли путем визуальной оценки окраски испытуемых растворов после нагревания их в суховоздушном термоблоке. Количественное определение проводили кинетическим фотоколориметрическим методом, обработку первичных данных выполняли с использованием программной среды R.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В результате испытаний с реактивами лизата амебоцитов (факторы С и G) и (фактор С) определено присутствие бета-глюканов в препарате «Бупивакаин»; количественное содержание бета-глюканов (более 2000 пг/мл) определено хромогенным кинетическим методом с помощью лизата амебоцитов (фактор G). В препарате «Икодекстрин» превышения нормативного содержания пептидогликанов (не более 200 пг/мл) не зафиксировано.



ВЫВОДЫ. Методы определения бета-глюканов и (или) пептидогликанов с использованием лизата амебоцитов и реактива из плазмы личинок шелкопряда могут быть применены для выявления данных примесей в лекарственных препаратах. При определении метода исследования следует учитывать состав лекарственного препарата и цель определения примесей.

Ключевые слова: пирогенные примеси; бактериальные эндотоксины; пептидогликаны; бета-глюканы; эндотоксин специфичный буфер; лизат амебоцитов; фактор С; фактор G; плазма личинок шелкопряда

Для цитирования: Шаповалова О.В., Неугодова Н.П. Определение бета-глюканов и пептидогликанов в лекарственных препаратах. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(6):672–681. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-6-672-681>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga V. Shapovalova 
Natalia P. Neugodova 

Identifying Beta-Glucans and Peptidoglycans in Medicinal Products

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ *Olga V. Shapovalova*; shapovalova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Beta-glucans and peptidoglycans are cell wall components of bacteria and fungi that are potential sources of pyrogenic contamination of parenteral medicines. Such impurities can cause adverse immune reactions. Therefore, recently, certain attention has been paid to identification of beta-glucans and peptidoglycans in medicines. Despite the lack of a harmonised detection method for beta-glucans and/or peptidoglycans, pharmaceutical industry uses several methods for identification and quantitation of these impurities.

AIM. This study aimed to assess applicability of the existing detection methods for beta-glucans and / or peptidoglycans in the medicinal products.

MATERIALS AND METHODS. Applicability of detection was examined for beta-glucans and peptidoglycans using amoebocyte lysate and silkworm larvae plasma as reagents. Beta-glucans were detected in Bupivacaine, the product that was previously found to have random glucan impurities. In the drug tests, three types of amoebocyte lysate reagents of different compositions were used reacting to 1) bacterial endotoxins and beta-glucans (lysate with factors C and G); 2) only bacterial endotoxins (lysate with factor C); 3) only beta-glucans (lysate with factor G). Peptidoglycans in Icodextrin were assessed using a reagent from the silkworm larvae plasma. For qualitative analysis, colour of the test solutions was visually assessed after heating them in a dry-air block heater. Kinetic photocolorimetric method was used for quantitation; the primary data were processed using R software.

RESULTS. As a result of two tests with amoebocyte lysate reagents (factors C and G) and (factor C), beta-glucans were detected in Bupivacaine. Chromogenic kinetic method using amoebocyte lysate (factor G) quantified the impurity, which exceeded 2,000 pg/mL. For Icodextrin, peptidoglycan reference content (not more than 200 pg/mL) was not exceeded.

CONCLUSIONS. Identification methods for beta-glucans and/or peptidoglycans using amoebocyte lysate and silkworm plasma are applicable for identifying these impurities in the medicinal products. While choosing a study method, product composition and analytical purpose are to be considered.

Keywords: pyrogenic impurities; bacterial endotoxins; peptidoglycans; beta-glucans; endotoxin-specific buffer; amoebocyte lysate; factor C; factor G; silkworm larvae plasma

For citation: Shapovalova O.V., Neugodova N.P. Identifying beta-glucans and peptidoglycans in medicinal products. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(6):672–681. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-6-672-681>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Бета-глюканы и пептидогликаны, наряду с бактериальными эндотоксинами (БЭ), являются основными маркерами микробиологического загрязнения лекарственных препаратов. И если методы определения БЭ широко известны, утверждены ведущими фармакопеями мира¹, постоянно совершенствуются и позволяют поддерживать высокий уровень безопасности в отношении данной пирогенной примеси, то мониторинг за примесями бета-глюканов и пептидогликанов практически не регламентирован. Неконтролируемое присутствие этих примесей в парентеральных препаратах может увеличить риск их применения. Даже если присутствие бета-глюканов и пептидогликанов не приводит к повышению температуры тела, они представляют собой пирогенные загрязнения, которые при взаимодействии с кровью или ее клеточными элементами способны вызывать нарушение гомеостаза и провоспалительную цитокиновую реакцию² [1].

Бета-глюканы или (1→3)-β-D-глюканы (БГ) представляют собой полисахариды из мономеров D-глюкозы, в которых мономерные звенья глюкозы связаны в полимерную структуру через β-1,4 и β-1,3 связи. БГ присутствуют в клеточных стенках широкого спектра прокариотических и эукариотических организмов, включая дрожжи, грибы, морские водоросли и злаки³. БГ являются потенциальными загрязнителями в фармацевтических продуктах, выделяющихся, например, из фильтров на основе целлюлозы или из фармацевтического сырья. Они схожи с БЭ тем, что являются крупными молекулами, которые также могут вызывать воспалительную реакцию [2].

На долю пептидогликанов в клеточной стенке грамположительных бактерий приходится 40%, у грамотрицательных – 1–10%⁴. Причиной пристального внимания к ПГ послужили многократные случаи асептического перитонита, связанные с применением препаратов икодекстрина в 2001–2003 г. Тогда у пациентов, находящихся на перитониальном диализе, наблюдались лихорадка и боли в животе. В связи с этим был проведен добровольный всемирный отзыв

нескольких сотен партий раствора для диализа, содержащего икодекстрин. Было обнаружено, что икодекстрин загрязнен термофильным ацидофильным грамположительным микроорганизмом *Alicyclobacillus acidocaldarius*, который и являлся источником ПГ. Нагревание и стерильная фильтрация устранили бактерии, но не ПГ, загрязнившие конечный продукт [3–5].

В результате анализа накопленной информации было установлено, что БГ и ПГ, которые могут образовываться в лекарственных препаратах на стадии их производства, могут потенцировать воздействие эндотоксинов, а также действие других иммунологически активных примесей. Именно поэтому некоторыми регуляторными органами, Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration (FDA))⁵ было предложено минимизировать уровень ПГ в терапевтических белковых препаратах для снижения рисков возникновения иммунного ответа [5, 6].

Несмотря на отсутствие гармонизированного подхода к обнаружению БГ и ПГ в лекарственных препаратах, в последнее время уделяется внимание мониторингу наличия данных примесей, а также установлению норм их предельного содержания для безопасного применения лекарственных препаратов [6]. Существует несколько подходов к нормированию БГ и ПГ:

- 1) согласно научным данным их эндогенный уровень у здорового человека составляет менее 60 пг/мл;
- 2) клинические исследования показали, что однократная доза 500 нг создает концентрацию в плазме около 100 пг/мл;
- 3) другие подходы основаны на расчетах, в которых учитываются индивидуальные характеристики препарата, путь и частота его введения, объем циркулирующей крови и вес пациента [2, 6];
- 4) в испытании на кроликах установлено, что минимальная пирогенная доза ПГ составляет 7,3 мкг/кг, в случае с БЭ – 0,0027 мкг/кг [4].

Методы определения БГ и ПГ могут быть использованы для контроля загрязнений диализных

¹ <85> Bacterial endotoxin test, USP 43, 2020; 2.6.14 Bacterial endotoxins, European Pharmacopoeia, 11.2 ed., 2023; 1143 Test for bacterial endotoxins, Chinese Pharmacopoeia, 2020; 4.01 Bacterial endotoxins test, Japanese Pharmacopoeia, 18th ed., 2021.

² Sandle T. Glucans and the bacterial endotoxin test. https://www.researchgate.net/publication/381254694_Glucans_and_the_Bacterial_Endotoxin_Test

³ Finkelman MA. (1→3)-β-D-glucan: Pharmaceutical contaminant and biological response modifier. <https://www.acciusa.com/pdfs/supplements/Endotoxin%20Detection%20Part%20IV/BG%20-%20Contaminant%20and%20Modifier%20-%20Finkelman.pdf>

⁴ Peptidoglycan contamination in pharmaceutical manufacturing, 2023. <https://www.wakopyrostar.com/blog/kit-lal/post/peptidoglycan-contamination-in-pharmaceutical-manufacturing/>

⁵ Immunogenicity assessment for therapeutic protein products. Guidance for industry, 2014. <https://www.fda.gov/media/85017/download>

растворов, фармацевтических и биологических препаратов, медицинских устройств или продуктов генной инженерии и т.д., а также для оценки микробиологического загрязнения воды⁶.

Для определения БГ и ПГ в фармацевтической практике используют два типа реактивов, которые реагируют на такие примеси: лизат амёбоцитов и реактив из плазмы личинок шелкопряда.

Метод 1. Качественное определение с помощью лизата амёбоцитов. Лизат амёбоцитов, содержащий два белка (фактор С и фактор G), пригоден для качественного определения примесей БЭ и БГ в лекарственных препаратах. Реактив запускает активацию протеолитического каскада в ответ на присутствие БЭ и БГ [6]. Получив положительный результат, необходимо уточнить, на какой тип примеси реактив отреагировал. Для этого следует повторить опыт, используя реактив лизата амёбоцитов, восстановленный эндотоксин-специфическим буфером, в составе которого присутствует карбоксиметилированный курдлан, блокирующий

влияние фактора G, оставляя способность фактора С специфически реагировать только на БЭ. Если в повторном испытании будет получен положительный результат, то можно сделать вывод, что в образце препарата присутствуют БЭ в определяемом количестве, а в случае, если результат отрицательный, БЭ в образце отсутствуют, а результат первого испытания говорит о наличии БГ (рис. 1) [7].

Метод 2. Количественное определение с помощью лизата амёбоцитов. Для обнаружения БГ используют реактив на основе лизата амёбоцитов с удаленным фактором С. Такой реактив доступен под разными торговыми наименованиями: Glucatell (Associates of Cape Cod, США), Endosafe®-PTST™ Glucan Assay (Charles River, США) и др. Методика определения и оценка результатов аналогичны хромогенному методу определения БЭ [6]. Фактор G лизата амёбоцитов активирует путь прокоагуляции ферментов в присутствии БГ, что приводит к расщеплению хромогенного пептидного субстрата

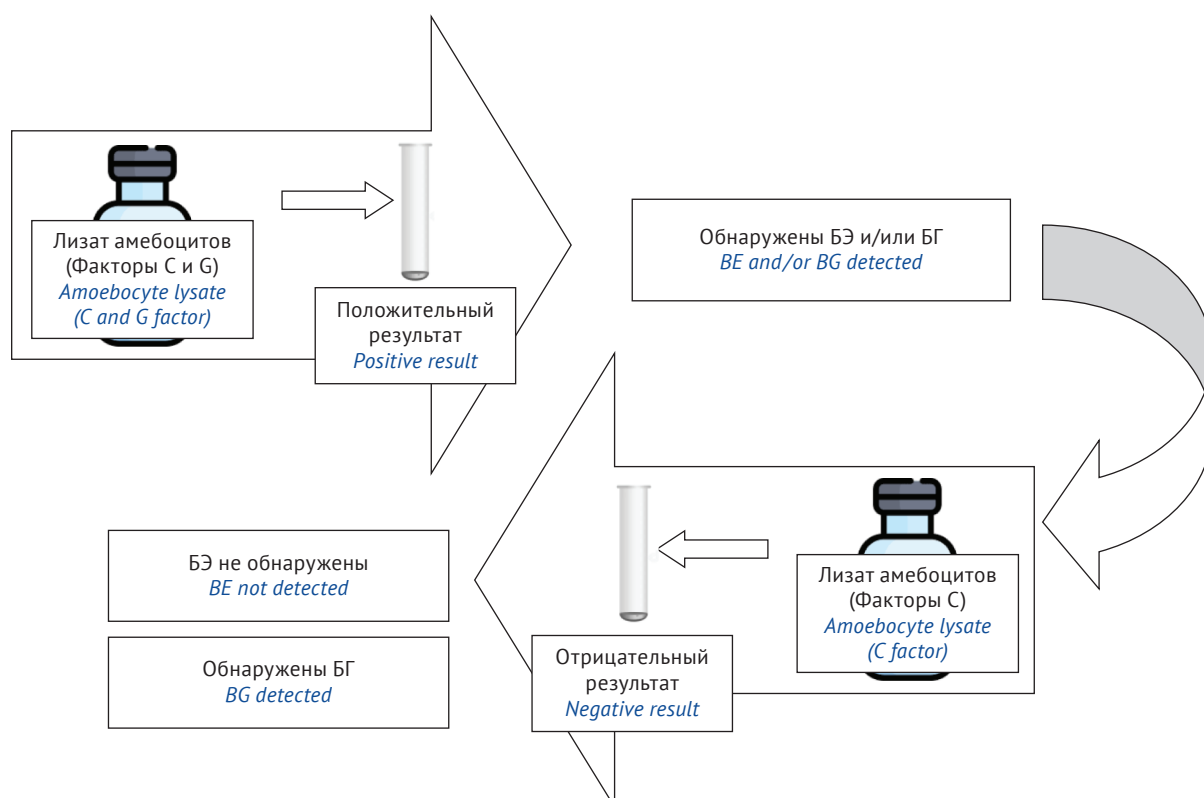


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Схема исследования влияния бета-глюканов в реакции с лизатом амёбоцитов (фактор С и G, фактор С)

Fig. 1. The study scheme of beta-glucans reacting with amoebocyte lysate (factor C and G, factor C)

Примечание. БЭ – бактериальные эндотоксины, БГ – бета-глюканы.

Note. BE, bacterial endotoxins; BG, beta-glucans.

⁶ Peptidoglycan contamination in pharmaceutical manufacturing, 2023. <https://www.wakopyrostar.com/blog/kit-lal/post/peptidoglycan-contamination-in-pharmaceutical-manufacturing/>

пара-нитроанилина [8, 9]. Количество БГ определяют кинетическим методом по скорости изменения интенсивности окраски (интенсивность окраски определяют по поглощению при длине волны 405 нм). В качестве альтернативы используют метод по конечной точке, согласно которому добавление диазореагентов позволяет остановить реакцию, после чего выполняют измерение поглощения при длине волны 540–550 нм⁷ [10].

Метод 3. Качественное и количественное определение с реактивом, содержащим плазму личинок шелкопряда. Действие специального реактива Silkworm Larvae Plasma (SLP) основано на механизме самозащиты гемолимфы шелкопряда вида *Bombyx mori*, где в присутствии БГ и ПГ запускается сигнальный каскад и активируется про-фенолоксидаза. Эта ферментативная система участвует в образовании меланина, который

запускает защитные механизмы в организме насекомого. Реактив SLP позволяет обнаруживать компоненты клеточных стенок бактерий и грибов по увеличению концентрации пигмента меланина в реакционной смеси⁸.

Методы 2 и 3 основаны на схожих принципах действия, но для их реализации используются разные реактивы⁹ (табл. 1). Все три вышеуказанных метода на практике используются применительно к лекарственным препаратам с потенциальным загрязнением БГ и (или) ПГ.

Цель работы – оценка практической значимости существующих методов обнаружения бета-глюканов и пептидогликанов в лекарственных препаратах. Задачи работы – оценка эффективности и воспроизводимости методик с использованием лизата амёбоцитов и реактива из плазмы личинок шелкопряда.

Таблица 1. Характеристики методов определения бета-глюканов и пептидогликанов

Table 1. Comparative analysis of identification methods for beta-glucans and peptidoglycans

Характеристики Parameters	Метод 2 Method 2	Метод 3 Method 3
Наименование реактива Reagent	GlucateLL	SLP-HS Single Reagent Set
Принцип определения Detection principle	Механизм самозащиты, обнаруженный в амёбоцитах мечехвоста (образование геля) <i>Self-preservation mechanism found in amoebocytes of horseshoe crabs (gel formation)</i>	Защитный механизм, обнаруженный в гемолимфе шелкопряда (образование пигмента меланина) <i>Self-preservation mechanism found in silkworm haemolymph (melanin formation)</i>
Тип определяемой примеси Type of identified impurity	Бета-глюканы <i>Beta-glucans</i>	Пептидогликаны, бета-глюканы <i>Peptidoglycans, beta-glucans</i>
Чувствительность определения, пг/мл Detection sensitivity, pg/mL	3,125	10
Контрольный стандарт Control standard	Бета-глюкан (<i>Poria cocos mycelia</i>) <i>Beta-glucan (Poria cocos mycelia)</i>	Пептидогликан / <i>Peptidoglycan (Staphylococcus aureus)</i> Курдлан / <i>Curdlan (Alcaligenes faecalis var. myxogenes)</i>
Вид определения Identification type	Количественный (инструментальный) <i>Quantitative (instrumental)</i>	Количественный (инструментальный), качественный (визуальный) <i>Quantitative (instrumental), qualitative (visual)</i>
Тип инструментального измерения (длина волны) Instrumental measurement (wavelength)	Хромогенный кинетический тест (405 нм) Хромогенный тест по конечной точке (540–550 нм) <i>Kinetic chromogenic test (405 nm)</i> <i>Endpoint chromogenic test (540–550 nm)</i>	Турбидиметрический тест по конечной точке (430 нм) Визуально, по интенсивности окраски <i>Turbidimetric endpoint test (430 nm)</i> <i>Visual (colour intensity)</i>
Температура инкубации Incubation temperature	37±1 °C	30 °C

Таблица составлена авторами / The table was prepared by the authors

⁷ GlucateLL®. <https://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/pisheets/GlucateLL%20Insert%20English.pdf>

⁸ Peptidoglycan and β -glucan detection. Quantitative analysis of pyrogens through kinetic colorimetric assay. https://www.bujinochem.com/wp-content/uploads/2019/09/FUJIFILM-Wako_SLP.pdf

⁹ LAL Update. 2001;19(3). https://www.acciusa.com/pdfs/newsletter/LAL_Vol.19No.3.pdf

SLP-HS Single reagent set II. https://labchem-wako.fujifilm.com/asia/lal/products/slp_hs_single_reagent_set2.html

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполняли с применением сушевоздушного нагревательного прибора (термоблока), фотокориметра BioTek ELx800 и программы для обработки результатов – программная среда R (4.4.2 (2024-10-31 ucrt) “Pile of Leaves”)¹⁰.

В качестве тест-объектов были выбраны лекарственные препараты, в которых случайным образом были обнаружены или могли бы содержаться БГ и ПГ в качестве технологической или родственной примеси. Препарат «Бупивакаин» был выбран в качестве исследуемого объекта в связи с получением положительного результата в ранее выполненных испытаниях геля-трома теста в разведении, равном 1/2 максимально допустимого разведения. Препарат «Икодекстрин» может содержать родственные примеси ПГ, поэтому имеется нормативное требование с указанием предельного значения ПГ, которое следует контролировать. Для исследования применяли методики, охарактеризованные в таблице 2.

Для исследования методом 1 использовали реактив лизата амебоцитов, восстановленный эндотоксин-специфичным буфером (реактив с фактором С); полученные данные сравнивали

с данными испытаний, выполненных без использования блокирующего буфера (реактив с факторами С и G).

Испытание по методу 2 выполняли аналогично испытанию по хромогенному кинетическому методу определения БЭ. Для построения стандартной калибровочной кривой готовили разведения контрольного стандарта бета-глюкана с концентрациями 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 пг/мл (КСБ₁–КСБ₆). В лунки микропланшета помещали по 25 мкл испытуемых проб, к которым добавляли 100 мкл восстановленного реактива лизата с фактором G (GlucateLL-реактив). Оптическую плотность растворов измеряли на фотокориметре.

По методу 3 выполняли качественную и количественную оценку содержания ПГ в лекарственном препарате «Икодекстрин». Для этого использовали реакционные пробирки с лиофилизированным SLP-реактивом, в которые перед испытанием добавляли по 100 мкл растворителя и перемешивали в течение нескольких секунд. Для качественного анализа в эти же пробирки добавляли исследуемые растворы и инкубировали в течение 60 мин при температуре 30 °С. Исследуемыми растворами являлись (табл. 3):

Таблица 2. Характеристики методик определения бета-глюканов и пептидогликанов в лекарственных препаратах

Table 2. Identification parameters of beta glucans and peptidoglycans in medicinal products

Тип метода <i>Method</i>	Наименование испытуемого препарата <i>Test product</i>	Используемые реактивы <i>Reagents</i>	Кратность испытуемого разведения <i>Multiplicity of the tested dilution</i>	Норма предельного содержания бета-глюканов / пептидогликанов (пг/мл) <i>Limit of content for beta-glucans / peptidoglycans (pg/mL)</i>
Метод 1 <i>Method 1</i>	Бупивакаин <i>Bupivacaine</i>	Набор реактивов Pyrotell 0,03 ЕЭ/мл (лизат амебоцитов, контрольный стандарт эндотоксина, эндотоксин-специфичный буфер Glucashield®) компании Associates of Cape Cod, Inc. <i>Assay kit Pyrotell 0.03 EU/mL (amoebocyte lysate, endotoxin control standard, endotoxin-specific Glucashield® buffer), manufacturer – Associates of Cape Cod, Inc.</i>	1:11	Не установлена <i>Not defined</i>
Метод 2 <i>Method 2</i>	Бупивакаин <i>Bupivacaine</i>	Набор GlucateLL Kinetic Kit (GlucateLL-реактив, растворитель для реактива, контрольный стандарт бета-глюкана) компании Associates of Cape Cod, Inc. <i>GlucateLL Kinetic Kit (GlucateLL reagent, reagent solvent, and beta-glucan control standard), manufacturer – Associates of Cape Cod, Inc.</i>	1:20	Не установлена <i>Not defined</i>
Метод 3 <i>Method 3</i>	Икодекстрин <i>Icodextrin</i>	Набор реактивов (SLP-реактив, растворитель для реактива, контрольный стандарт пептидогликана) компании FUJIFILM Wako Chemicals <i>Assay kit (SLP reagent, reagent solvent, and peptidoglycan control standard), manufacturer – FUJIFILM Wako Chemicals</i>	1:20	Не более 200 <i>Not more than 200</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

¹⁰ The R Project for statistical computing. <https://www.R-project.org/>

Таблица 3. Испытуемые пробы для качественного анализа с реактивом, содержащим плазму личинок шелкопряда

Table 3. Test samples for qualitative analysis with a reagent containing silkworm larvae plasma

Маркировка пробирок <i>Labelling of test tubes</i>	Обозначение пробирок <i>Designation of test tubes</i>	Используемые объемы растворов (мкл) <i>Solution volumes used (μL)</i>		
		Икодекстрин <i>Icodextrin</i>	Вода для определения бактериального эндотоксина <i>Water for bacterial endotoxin test</i>	Контрольный стандарт пептидогликана <i>Peptidoglycan control standard</i>
<i>Испытуемый препарат / Test product</i>				
П-	Икодекстрин в разведении 1:20 <i>Icodextrin at a dilution 1:20</i>	100	–	–
<i>Контрольные растворы / Control solutions</i>				
П+	Икодекстрин в разведении 1:20 с концентрацией пептидогликана 200 пг/мл <i>Icodextrin diluted 1:20, with peptidoglycan concentration 200 pg/mL</i>	100	–	10
КСП ₁ – КСП ₅	Растворы контрольного стандарта пептидогликана с концентрациями: 100000, 10000, 1000, 100, 10 пг/мл <i>Peptidoglycan control standard solutions at concentrations of: 100,000, 10,000, 1,000, 100, and 10 pg/mL</i>	–	–	100
К-	Разбавитель, вода для определения бактериального эндотоксина <i>Solvent, water for bacterial endotoxin test</i>	–	100	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» – не используется.

Note. –, not used.

- икодекстрин в испытуемом разведении для определения наличия ПГ – (П-);
- икодекстрин в испытуемом разведении с ПГ в количестве, равном норме предельного содержания – (П+);
- растворы стандарта ПГ в разных концентрациях для получения эталонной шкалы цвета (качественный анализ) и построению стандартной калибровочной кривой (количественный анализ) – (КСП₁ – КСП₅);
- вода для теста, определяющего БЭ (вода для БЭТ) в качестве отрицательного контроля – (К-).

По окончании инкубации визуально оценивали результаты. Бесцветные растворы принимали за отрицательный результат (отсутствуют ПГ и БГ), окрашенные – за положительный результат. Сравнивали интенсивность окрашенных растворов: чем более насыщенный фиолетовый цвет раствора, тем выше концентрация ПГ и БГ.

Для количественного анализа использовали такие же испытуемые растворы, как и для качественного (табл. 3), с тем различием, что конечная концентрация ПГ в растворе с маркировкой

(П+) составляла 1000 пг/мл и соответствовала среднему значению концентраций растворов КСП₁–КСП₅, использованных для построения стандартной калибровочной кривой. Из пробирок в лунки микропланшета переносили по 50 мкл каждого раствора, затем восстановленный реактив извлекали из пробирок, объединяли содержимое в апиrogenном флаконе и добавляли к испытуемым пробам. Выполняли измерение оптической плотности относительно времени реакции. Содержание ПГ определяли по стандартной калибровочной кривой растворов КСП₁–КСП₅.

Результаты испытаний количественного определения методов 2 и 3 считали достоверными при соблюдении следующих условий¹¹:

- 1) коэффициент корреляции стандартной калибровочной кривой, построенной на основании данных растворов КСБ₁–КСБ₆, КСП₁–КСП₅, ≥ 0,980;
- 2) концентрация КСП в растворе (П+) (положительный контроль) составляет 50–200% от номинальной величины;
- 3) результат, полученный для воды БЭТ (К-), не превышает значения наименьшей концентрации КСБ или КСП на стандартной калибровочной кривой.

¹¹ GlucateLL®. <https://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/pisheets/GlucateLL%20Insert%20English.pdf>

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы установить причину положительной реакции лизата амебоцитов с препаратом «Бупивакаин», было выполнено испытание по методу 1. В испытании с лизатом амебоцитов, содержащим факторы С и Б и, соответственно, реагирующим на БГ и БЭ, подтверждено наличие плотного геля во всех пробах с препаратом, что свидетельствовало о наличии пирогенных примесей. В повторных испытаниях с использованием лизата, содержащего только фактор С и, соответственно, дающего реакцию только в присутствии БЭ, получены отрицательные результаты для растворов (П-). Сравнив данные двух испытаний, авторы сделали однозначное заключение об отсутствии БЭ и наличии БГ в лекарственном препарате «Бупивакаин».

На основании полученных данных следующее испытание, выполненное по методу 2, позволило подтвердить наличие БГ и определить их количество в препарате «Бупивакаин». Параметр, характеризующий искомое количество БГ в растворе лекарственного препарата, разведенного в 20 раз, составил более 100 пг/мл, что выходит за пределы стандартной калибровочной кривой (рис. 2). Таким образом, содержание БГ в препарате «Бупивакаин» составляет более 2000 пг/мл (100 пг/мл × кратность разведения 1:20).

При использовании растворов контрольного стандарта ПГ различной концентрации методом № 3 получена эталонная цветовая шкала (рис. 3). Подтверждена чувствительность SLP-реактива, о чем свидетельствуют заметные изменения интенсивности фиолетового окрашивания растворов с увеличением концентрации ПГ. При визуальной фиксации результатов эксперимента установлено, что содержание ПГ в растворах испытуемого препарата икодекстрина (П-) меньше наименьшего значения концентрации стандарта КСП₅ (<10 пг/мл). Соответственно, в исходном растворе препарата содержание примесей не превышает 200 пг/мл

(10 пг/мл × кратность разведения 1:20). Цвет раствора в пробирке (П+) соответствовал градации цвета, представленной на шкале, что означает, что в составе раствора препарата, к которому добавлен контрольный стандарт ПГ, отсутствовали компоненты, препятствующие взаимодействию с реактивом (рис. 4). Таким образом, вероятность возникновения ложных результатов в данном испытании была исключена.

В растворе икодекстрина, согласно результатам количественного анализа, ПГ не обнаружены в количестве, превышающем нормируемое значение – «не более 200 пг/мл» (рис. 5). Для раствора положительного контроля (П+) содержание добавленного стандарта ПГ составило 59% от установленного значения, что соответствует критериям приемлемости (50–200%).

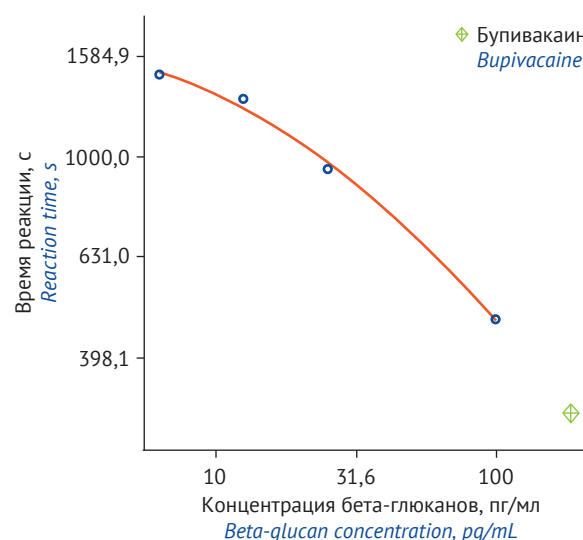


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Стандартная калибровочная кривая с концентрациями стандарта бета-глюкана и результаты испытаний бупивакаина

Fig. 2. Standard calibration curve with beta-glucan standard concentrations and bupivacaine test results

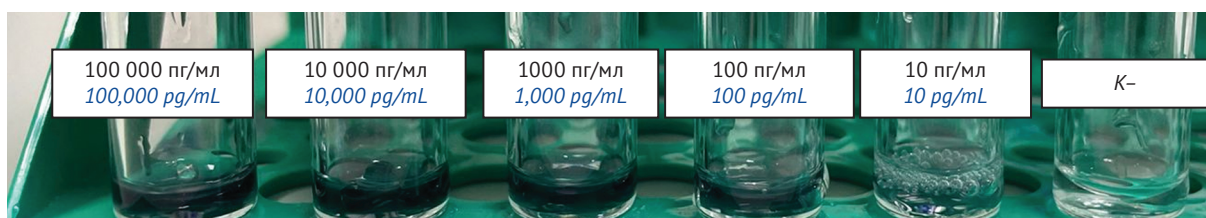


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Цветовой ряд растворов стандарта пептидогликана разной концентрации для определения результатов качественного (визуального) метода. Цветопередача на рисунке может быть искажена, следует ориентироваться не на оттенок, а на интенсивность окрашивания

Fig. 3. Colour scale for peptidoglycan standard solutions of different concentrations for scoring the results of the qualitative (visual) method. Since colour designations can be misleading, chroma is a priority over the shade

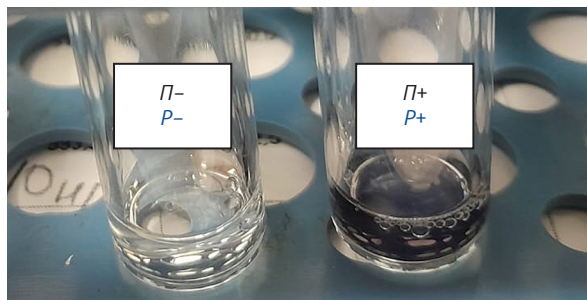


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Испытуемые растворы икодекстрина для визуального определения результатов. Цветопередача на рисунке может быть искажена, следует ориентироваться не на оттенок, а на интенсивность окрашивания

Fig. 4. Icodextrin test solutions for visual recording of results. Since colour designations can be misleading, chroma is a priority over the shade

Примечание. P- – икодекстрин в испытуемом разведении для определения наличия ПГ; P+ – икодекстрин в испытуемом разведении с ПГ в количестве, равном норме предельного содержания.

Note. P-, icodextrin test dilution for peptidoglycan identification; P+, icodextrin test dilution, with peptidoglycans equal to the cutoff value.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выбор метода определения БГ и (или) ПГ зависит от целей их определения и состава лекарственного препарата.

Используемые методы и реактивы позволили провести мониторинг наличия БГ и ПГ в исследуемых лекарственных препаратах. Несмотря на то что для препарата «Бупивакаин» не предусмотрено требование к содержанию БГ, данную примесь обнаружили в процессе определения БЭ в препарате с помощью реактива лизата амебоцитов. Выявленное количество БГ (более 2000 пг/мл) выше нормируемого значения,

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ławniczek-Wałczyk A, Górny RL. Endotoxins and β -glucans as markers of microbiological contamination – characteristics, detection, and environmental exposure. *Ann Agric Environ Med.* 2010;17(2):193–208. PMID: 21186760.
2. Barton C, Vigor K, Scott R, et al. Beta-glucan contamination of pharmaceutical products: How much should we accept? *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(11):1289–301. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1875-9>
3. Johnson DW, Krediet RT. New peritoneal dialysis solutions and solutions on the horizon. In: Khanna R, Krediet RT, eds. *Nolph and Gokal's Textbook of peritoneal dialysis.* Springer, Cham; 2023. P. 393–415. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62087-5_11
4. Martis L, Patel M, Giertych JA, et al. Methods and compositions for detection of microbial contaminants in peritoneal dialysis solution. Patent of the USA No. US7618392B2; 2004.
5. Martis L, Patel M, Giertych J, et al. Aseptic peritonitis due to peptidoglycan contamination of pharmacopoeia standard dialysis solution. *Lancet.* 2005;365(9459):588–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17908-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17908-2)
6. Neun BW, Cedrone E, Potter TM, et al. Detection of beta-glucan contamination in nanotechnology-based formulations. *Molecules.* 2020;25(15):3367. <https://doi.org/10.3390/molecules25153367>
7. Шаповалова ОВ, Неугодова НР, Сапожникова ГА и др. Определение бактериальных эндотоксинов в лекарственных средствах: Мешающие факторы и их устранение. *Фармация.* 2017;(6):9–14. Shapovalova OV, Neugodova NP, Sapozhnikova GA, et al. Detection of bacterial endotoxins in drugs: disturbing factors and their elimination. *Pharmacy.* 2017;(6):9–14 (In Russ.). EDN: ZGZTFT

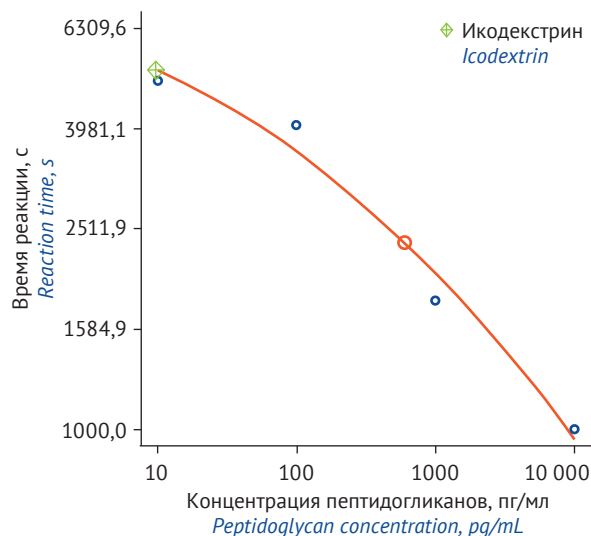


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Стандартная калибровочная кривая зависимости времени реакции от концентрации пептидогликана и результаты испытаний икодекстрина

Fig. 5. Standard calibration curve reflecting reaction time dependence on peptidoglycan concentration and the results of icodextrin tests

что нежелательно из-за возможных иммунных реакций.

Примесь ПГ эффективно определяли с помощью реактива из плазмы личинок шелкопряда. Последовательные качественные и количественные исследования подтвердили отсутствие ПГ как потенциального источника загрязнений в препарате «Икодекстрин».

При расширении области применения методов определения БГ и ПГ надежность контроля качества лекарственных препаратов может быть существенно повышена, что позволит избежать нежелательных иммунных реакций.

8. Song J, Kim S, Park J, et al. Comparison of two β -D-glucan assays for detecting invasive fungal diseases in immunocompromised patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021;101(1):115415. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115415>
9. Kumar M, Mugunthan M. β -d-Glucan and *Aspergillus Galactomannan* assays in the diagnosis of invasive fungal infections. *Med J Armed Forces India*. 2019;75(4):357–60. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2017.10.005>
10. Burgmaier L, Illes B, Leiss M, et al. Effects of different container types on (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan recovery. *Molecules*. 2023;28(19):6931. <https://doi.org/10.3390/molecules28196931>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад авторов распределен следующим образом: О.В. Шаповалова – планирование исследования, получение первичных экспериментальных результатов, сбор литературы, написание, оформление и редактирование текста рукописи; Н.П. Неугодова – обоснование концепции исследования, анализ и систематизация экспериментальных данных, критический пересмотр текста рукописи и утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Благодарности. Авторы выражают особую благодарность и признательность компаниям ООО «Альгимед» и ООО «ЛАЛ-Консалтинг ЛТД» за предоставленную информационную поддержку и техническую помощь.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Olga V. Shapovalova* planned the research, obtained primary experimental results, collected literature, drafted, formatted, and edited the manuscript. *Natalia P. Neugodova* substantiated the research concept, analysed and systematised experimental data, critically revised the manuscript text and approved the final version for publication.

Acknowledgements. The authors would like to thank ООО Algimed and ООО LAL Consulting Ltd. for their informational assistance and technical support.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Шаповалова Ольга Владимировна, канд. фарм. наук / *Olga V. Shapovalova*, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0305-7769>

Неугодова Наталия Петровна, канд. биол. наук / *Natalia P. Neugodova*, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

Поступила 22.08.2025

После доработки 16.09.2025

Принята к публикации 15.10.2025

Received 22 August 2025

Revised 16 September 2025

Accepted 15 October 2025