

DETERMINATION OF HYDROXYPROLINE IN COLLAGEN BIOMATERIALS FOR MEDICAL USE AND VALIDATION OF METHOD

DETERMINAREA HIDROXIPROLINEI DIN BIOMATERIALELE COLAGENICE PENTRU UZ MEDICAL SI VALIDAREA METODEI

Gabriela MACOVESCU^{*}, Ciprian CHELARU, Mădălina Georgiana ALBU KAYA, Luminița ALBU

INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu, 031215, Bucharest, Romania, icpi@icpi.ro

DETERMINATION OF HYDROXYPROLINE IN COLLAGEN BIOMATERIALS FOR MEDICAL USE AND VALIDATION OF METHOD

ABSTRACT. The paper presents a method for determining hydroxyproline in collagen biomaterials for medical use produced in The Collagen Department of INCDTP – Division ICPI and its validation. The method has two stages: the first one consists in hydrolysis of proteins in the sample of protein product to the form of amino acids, among which hydroxyproline. The second stage refers to selective highlighting of hydroxyproline using a specific colour reaction and quantitative assessment against a reference standard with known concentration. The method was validated to establish performance parameter and to check compliance with the set goal.

KEY WORDS: biomaterials, hydroxyproline, validation of method, collagen

DETERMINAREA HIDROXIPROLINEI DIN BIOMATERIALELE COLAGENICE PENTRU UZ MEDICAL SI VALIDAREA METODEI

REZUMAT. Lucrarea prezinta o metoda de determinare a hidroxiprolinei din biomaterialele colagenice pentru uz medical produse în Departamentul Colagen al INCDTP – Sucsursala ICPI și validarea ei. Metoda are două etape: prima constă în hidroliza proteinelor din proba de produs proteic până la stadiul de aminoacizi, printre care și hidroxiprolina. A doua etapă se referă la evidențierea selectivă a hidroxiprolinei printr-o reacție specifică de culoare și evaluarea cantitativă fata de un standard de referință cu concentrație cunoscută. Metoda a fost validată pentru a se stabili parametrii de performanță și pentru verificarea conformării cu scopul propus.

CUVINTE CHEIE: biomateriale, hidroxiprolina, validare metoda, colagen

LA DÉTERMINATION DE L'HYDROXYPROLINE DANS LES BIOMATÉRIAUX DE COLLAGÈNE POUR UTILISATION MÉDICALE ET LA VALIDATION DE LA MÉTHODE
RÉSUMÉ. Cet article présente une méthode de détermination de l'hydroxyproline dans les biomatériaux de collagène pour utilisation médicale produits dans le Département de Collagène de INCDTP - Division ICPI et la validation de cette méthode. La méthode comporte deux étapes: la première consiste en l'hydrolyse des protéines dans l'échantillon de produit protéique jusqu'à l'étape d'acides aminés, y compris l'hydroxyproline. La deuxième étape se réfère à la mise en évidence sélective de l'hydroxyproline par une réaction de couleur spécifique et à l'évaluation quantitative contre un étalon de référence de concentration connue. La méthode a été validée pour déterminer les paramètres de performance et pour vérifier la conformité avec le but fixé.

MOTS-CLÉS: biomatériaux, hydroxyproline, validation de la méthode, collagène

INTRODUCTION

The quality of products for medical use is a particularly complex concept because, unlike that of other industrial products, it has a much wider scope and much deeper effects. If for most industrial products quality is a well-defined property or set of physical-chemical properties, in the case of products for medical use, quality encompasses physical-chemical, biochemical, microbiological and toxicological characteristics. By their nature, these have profound implications on life, as they are an essential factor of metabolic processes and balance of the human body.

INTRODUCERE

Calitatea produselor pentru uz medical este un concept deosebit de complex deoarece, spre deosebire de cea a altor produse industriale, ea are un cuprins mult mai larg și efecte mult mai profunde. Dacă pentru majoritatea produselor industriale, calitatea se caracterizează printr-o însușire sau grup de însușiri fizice și chimice bine definite, în cazul produselor pentru uz medical calitatea înglobează caracteristici fizico-chimice, biochimice, microbiologice și toxicologice. Acestea, prin calitatea lor, au implicații profunde asupra vieții deoarece reprezintă un factor esențial al proceselor metabolice și al echilibrului organismului.

* Correspondence to: Gabriela MACOVESCU, INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu, 031215, Bucharest, Romania, icpi@icpi.ro

Medical product manufacturers are responsible for the health of consumers, participating in one of the most effective health protection and promotion methods. As a result, products must fulfill three major requirements: i) therapeutic qualities; ii) hygiene qualities; iii) sensory qualities.

These requirements impose constant control by using complex and advanced methods that allow reliable and reproducible data.

Promoting such products requires the existence of relevant knowledge regarding the presence of biologically active compounds in the range of raw materials used and the assessment of their content in terms of functional components.

Due to its excellent biocompatibility and biodegradability, well-defined structure, biological characteristics and method of interaction with the body, collagen is one of the most frequently used biomaterials for medical treatment. Extracted in the form of aqueous solution or gel, type I fibrillar collagen may be modelled into various products: medical devices, artificial implants, drug release systems, creams and scaffolds for tissue regeneration, with important role in medicine [1-6].

Collagen itself is considered an active drug/principle, used – in various forms – as hemostatic and dressing in the treatment of various types of wounds.

Collagen is the basis of intercellular matter of conjunctive tissue found in bones, teeth, cartilage, tendons, ligaments, skin, blood vessels and has an important role in a series of physiological processes, provides resistance and structural integrity to the body. An increase in catabolism and collagen regeneration are important information in the pathogenesis of many diseases.

Collagen, a natural protein, cannot heal infected tissue by itself, as bacteria may use it as a substrate. In severe wound infections, systemic drug administration may lead to insufficient drug concentration at the infected site or to side effects associated to the drug and/or systemic toxicity. This deficiency found its successful resolution in local drug applications, by developing drug release systems using collagen as substrate and an antibiotic/antiseptic as drug for infection control [2, 4, 7, 8].

Realizând produse pentru uz medical, producătorii sunt responsabili de starea de sănătate a consumatorilor, participând la una dintre cele mai eficiente căi de ocrotire și promovare a sănătății. Ca urmare, produsele trebuie să fie sub imperiul a trei mari cerințe: i) să posedă calități terapeutice; ii) să posedă calități igienice; iii) să posedă calități senzoriale.

Aceste cerințe impun un permanent control prin utilizarea unor metode complexe și performante care să permită obținerea unor date certe și reproductibile.

Promovarea unor astfel de produse necesită existența unor cunoștințe relevante privind prezența unor compuși biologic activi în diversele materii prime utilizate și evaluarea conținutului lor în componente care le conferă funcționalitate.

Datorită biocompatibilității și biodegradabilității excelente, a structurii bine definite, a caracteristicilor biologice și a modului în care interacționează cu organismul, colagenul reprezintă unul dintre cele mai utilizate biomateriale utilizate în tratamente medicale. Extras sub formă de soluție apoasă sau gel, colagenul fibrilar tip I poate fi modelat în diferite forme: dispozitive medicale, implanturi artificiale, suporturi pentru cedarea medicamentelor, creme și schelete pentru regenerare tisulară, cu un rol important în medicină [1-6].

Colagenul însuși este considerat medicament/principiu activ, fiind utilizat – sub diferite forme – ca hemostatic și pansament în tratamentul diferitelor tipuri de leziuni.

Colagenul este baza materiei intercelulare a țesutului conjunctiv prezent în oase, dinți, cartilaje, tendoane, ligamente, tegument, vase de sânge și are un rol important într-o serie de procese fiziologice, conferă organismului rezistență și integritate structurală. O creștere a catabolismului și regenerarea colagenului sunt informații importante în patogeneza multor boli.

Colagenul, fiind o proteină naturală, nu poate vindeca singură țesutul infectat deoarece bacteriile îl pot utiliza ca substrat. În infecțiile severe ale rănilor, administrarea sistemică a medicamentelor poate conduce la o concentrație insuficientă de medicament la locul infectat sau la efecte secundare asociate medicamentului și/sau la toxicitate sistemică. Această deficiență și-a găsit rezolvarea cu succes în aplicațiile locale ale medicamentelor, dezvoltându-se astfel sisteme de cedare care au ca suport colagenul și ca medicament un antibiotic/antiseptic pentru controlul infecției [2, 4, 7, 8].

The presence of collagen in the body is essential for healing minor skin injuries, as well as wounds in different tissues, for repairing cartilage, ligaments and bones, including even dental degeneration.

A natural polymer, collagen is made up of 20 amino acids, arranged in characteristic sequences that form a highly complex conformational structure, organized into four levels, called primary, secondary, tertiary and quaternary structures.

Collagen differs from regular proteins by the fact it includes a higher concentration of certain amino acids. Almost a third of collagen composition is glycine, the smallest amino acid, and another third is proline and hydroxyproline, the active form of proline, an amino acid specific to collagen.

The most recent data regarding collagen composition shows that hydroxyproline residues are present in the major phenotype of type I collagen in a ratio of approximately 11.3 wt%. The ratio of hydroxyprolyl residue in type II collagen from cartilage and in type IV collagen from basement membranes ranges from 12.9% and 14.3%, and is approximately 15.0% in type III collagen [9, 10].

Hydroxyproline is an amino acid irreversibly synthesized from post translational hydroxylation of proline by prolyl hydroxylase. As hydroxyproline was found in very few proteins, other than collagen, hydroxyproline determination was used as a marker to quantify collagen and/or gelatin levels (from partial collagen hydrolysis resulting in a mixture of proteins and peptides).

Hydroxyproline determination is used to identify certain diseases that involve breakdown of collagen. Increased values of hydroxyproline have been correlated to bone metastasis, prostate carcinoma or hepatic fibrosis. Hydroxyproline dosing is also used in the food industry in quality control of meat and meat products [11].

Several experimental hydroxyproline determination approaches were found in the literature differing depending the nature of the material to be tested.

Tissue subjected to analyses are first hydrolysed with acid to release hydroxyproline. This is generally performed using hydrochloric acid solution 6M or sulphuric acid 6M at temperatures from 110 to 130°C

Prezența colagenului în organism este esențială pentru vindecarea rănilor usoare ale pielii, dar și a rănilor din diferite țesuturi, pentru repararea cartilajilor, ligamentelor și oaselor, inclusiv chiar și degenerăridentare.

Polimer natural, colagenul este constituit din 20 de aminoacizi, aranjați în secvențe caracteristice, ce formează o structură conformatiională foarte complexă, organizată pe patru nivele, numite structuri primară, secundară, terțiară și cuaternară.

Colagenul diferă de proteinele obișnuite prin faptul că are în compoziție o mai mare concentrație de anumiti aminoacizi. Aproape o treime din colagen este compusă din glicină, cel mai mic aminoacid și o altă treime este formată din prolină și hidroxiprolină, forma activă a prolinei, aminoacid specific colagenului.

Cele mai recente date privind compoziția colagenului arată că reziduurile hidroxiprolinei sunt prezente în fenotipul major al colagenului tip I, în proporție de aproximativ 11,3% în greutate. Ponderile reziduului hidroxiprolil din colagen tip II din cartilaje și colagen tip IV din membranele bazale sunt cuprinse între 12,9% și 14,3% și sunt de aproximativ 15,0% în colagenul de tip III [9, 10].

Hidroxiprolina este un aminoacid care este sintetizat ireversibil din hidroxilarea post-translațională a prolinei de către prolil hidroxilază. Deoarece hidroxiprolina a fost găsită în foarte puține proteine, altele decât colagenul, măsurarea hidroxiprolinei a fost folosită ca un marker pentru a quantifica nivelurile de colagen și/sau gelatină (din hidroliza parțială a colagenului rezultând un amestec de proteine și peptide).

Măsurarea hidroxiprolinei este utilizată pentru a identifica anumite boli care implică liza colagenului. Valori crescute ale hidroxiprolinei au fost corelate cu metastaze osoase, cu carcinom de prostată, sau cu fibroza hepatică. Dozarea hidroxiprolinei se utilizează și în industria alimentară la controlul calitativ al cărni și al produselor din carne [11].

Pentru determinarea hidroxiprolinei, în literatura de specialitate au fost găsite mai multe abordări experimentale diferite în funcție de natura materialului de testat.

Țesuturile supuse analizelor sunt mai întâi hidrolizate cu acid pentru a se elibera hidroxiprolina. Acest lucru este în general realizat folosind soluție de acid clorhidric 6M sau acid sulfuric 6M la temperaturi

for 10 to 24 hours, either in sealed tubes or in reflux condensers.

Other researchers used perchloric acid 72% at 100°C for 2-4 hours [12, 13] or sulphuric acid 3M at 105°C for 16 hours, as specified in ISO 3496: 1994 for determination of hydroxyproline in meat and meat products [11].

Free hydroxyproline is most conveniently quantified colorimetrically after oxidation to pyrrole, which is then reacted specifically with p-dimethylaminobenzaldehyde (Ehrlich's reagent) to produce an intense red-brown compound. Chloramine-T is now generally preferred as oxidant in pyrrole formation.

In the case of collagen-rich foodstuff, three methods are most used, but the most often used is the one proposed by the International Standard Organization in ISO 3496:1994 that was developed specifically for determining hydroxyproline in meat or meat products.

For routine analysis, the amino analyzer is a convenient means for treating a large number of samples. Also, for medical analyses of bodily fluids (blood, urine, plasma) rapid, but not economical, methods have been developed using kits.

After acid hydrolysis of the collagen material, several methods may be used for the quantitative determination of 3-hydroxyproline and 4-hydroxyproline by high-performance liquid-chromatography [14-16], or by gas chromatography using volatile derivatives, such as esters [17, 12, 13], trifluoroacetyl-butyl or isobutyl, or N-heptafluorobutyryl [18], laborious methods which are suitable for low contents in the samples.

The most frequently used is still the spectrophotometric method for the determination of hydroxyproline, based on the reaction with Ehrlich's reagent [19-24].

The chemical mechanism of this process can be described as follows: the structure of hydroxyproline contains a pyrrolidine ring, which may undergo oxidative dehydration to a pyrrole ring, which may be subsequently identified through a reaction with Ehrlich's reagent or p-dimethylaminobenzaldehyde. The resulting quinoid compound is intensely colored (color depends on the substituents and ranges from orange to purple).

cuprinse între 110-130°C timp de 10 până la 24 ore, fie în tuburi sigilate, fie sub reflux cu condensator de aer.

Alți cercetători au folosit acid percloric 72% la 100°C timp de 2-4 ore [12, 13] sau acid sulfuric 3M la 105°C timp de 16 ore, cum este specificat în ISO 3496: 1994 pentru determinarea hidroxiprolinei din carne și din produse din carne [11].

Hidroxiprolina liberă este cuantificată cel mai convenabil colorimetric după oxidarea la pirol, care este apoi reacționat în mod specific cu p-dimetil-amino benzaldehidă (reactivul Ehrlich) pentru a produce un compus intens de culoare roșu-brun. Cloramina T este acum în general preferată pentru utilizarea ca oxidant în formarea pirolului.

Pentru materialele alimentare bogate în colagen, cel mai mult sunt folosite trei metode, dar cea mai uzitată este cea propusă de Organizația Internațională pentru Standarde în ISO 3496: 1994 care a fost dezvoltată în mod special pentru determinarea hidroxiprolinei din carne sau produse din carne.

Pentru analize de rutină aminoanalizorul reprezintă un mijloc convenabil pentru tratarea unui număr mare de probe. De asemenea, pentru analizele medicale din lichide fiziolegice (sânge, urină, plasmă) s-au dezvoltat metode rapide, dar nu prea economice, care folosesc kituri.

După hidroliza acidă a materialului colagenic există mai multe metode publicate pentru determinarea cantitativă sensibilă prin cromatografie lichidă de înaltă performanță a 3-hidroxiprolină și 4-hidroxiprolină [13-15] sau prin cromatografie de gaz folosind derivați volatili, cum ar fi esteri [17, 12, 13], trifluoracetil de butil sau izobutil sau N-heptafluorbutiril [18], metode laborioase și care se pretează pentru conținuturi reduse în probe.

Cea mai uzitată metodă rămâne însă metoda de determinare spectrofotometrică a hidroxiprolinei care se bazează pe reacția cu reactiv Ehrlich [19-24].

Mecanismul chimic al acestui proces poate fi descris după cum urmează: hidroxiprolina conține în structură un inel de pirolidină, care poate suferi oxidativ o dehidrogenare până la un inel de pirol, care poate fi identificat ulterior folosind o reacție cu reactiv Ehrlich sau p-dimetilaminobenzaldehidă. Compusul quinoid rezultat este intens colorat (culoarea depinde de substituenți și variază de la portocaliu la lila).

The use of compounds such as hydrogen peroxide, Chloramine-B or Chloramine-T is reported in the literature for oxidative dehydrogenation [24-26].

As a result of the literature review on methods for the determination of hydroxyproline in tissues, meat and meat products, bodily fluids and various types of collagen, the method presented below was adapted and used for protein-based products intended for medical use.

MATERIALS AND METHOD

Method Principle

Hydroxyproline determination is performed taking into account the following three basic steps:

a) hydroxyproline is derivatized from collagen by hydrolysis with sulphuric acid, at high temperature, 105°C;

b) hydroxyproline is oxidized by adding Chloramine-T, and the oxidation product is subjected to decarboxylation to pyrrole, in an acid medium at high temperature;

c) pyrrole combines, in an acid medium, with p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) and the resulting addition product is determined by measuring the solution absorbance at 558 nm.

Hydroxyproline content is calculated and expressed as mass percentage.

Reagents

Only known analytical grade reagents (SIGMA ALDRICH) and distilled water, demineralized water or water equivalent in purity are used.

1. Sulphuric acid solution, 3 mol/L.

2. Buffer solution, pH = 6.8, consisting of:

- 26.0 g citric acid monohydrate;
- 14.0 g sodium hydroxide;
- 78.0 g sodium acetate anhydrous

Reagents are dissolved in 500 mL water and quantitatively transferred in a 1 litre volumetric flask. 250 mL N-propanol are added and water is filled up to the mark. When stored at the temperature of 4°C in the dark, this solution is stable up to a few weeks.

Pentru dehidrogenarea oxidativă, în literatură se utilizează compuși ca perhidrol, Cloramina B sau Cloramina T [24-26].

Ca urmare a studiului de literatură privind metodele de determinare a hidroxiprolinei din ţesuturi, din carne și produse din carne, din lichide fiziole și din diferitele tipuri de colagen, s-a făcut o adaptare a metodei care este expusă mai jos și s-a folosit pentru produsele proteice pentru uz medical.

MATERIALE ȘI METODĂ

Principiul metodei

Determinarea hidroxiprolinei se efectuează luând în considerare următoarele trei etape de bază:

a) hidroxiprolina este derivatizată din colagen prin hidroliză cu acid sulfuric, la temperatură ridicată, 105°C;

b) hidroxiprolina este oxidată prin adăugarea de Cloramină-T, iar produsul de oxidare este supus, într-un mediu acid, la temperatură ridicată, decarboxilării la pirol;

c) pirolul se combină, într-un mediu acid, cu p-dimetilaminobezaldehidă (DMAB) și produsul de adiție obținut este determinat prin măsurarea absorbanței soluției la 558 nm.

Conținutul de hidroxiprolină este calculat și exprimat ca procente de masă.

Reactivi

Se utilizează numai reactivi de calitate analitică recunoscută (SIGMA ALDRICH) și apă distilată sau apă demineralizată sau apă echivalentă ca puritate.

1. Soluție de acid sulfuric, 3 mol/l.

2. Soluție tampon, pH = 6,8, constând din:

- 26,0 g acid citric monohidrat;
- 14,0 g de hidroxid de sodiu;
- 78,0 g de acetat de sodiu anhidru.

Se dizolvă reactivii în 500 ml de apă și se transferă cantitativ într-un balon cotat de 1 litru. Se adaugă 250 ml de N-propanol și se completează până la maraj cu apă. Când este depozitată la temperatura de 4°C în întuneric, această soluție este stabilă timp de câteva săptămâni.

3. Chloramine-T

1.41 g N-chloro-p-toluenesulfonamide sodium salt trihydrate (Chloramine-T) are dissolved in 100 mL buffer solution. This solution is prepared immediately before use.

4. Colour reagent

10.0 g p-dimethylaminobenzaldehyde are dissolved in 35 mL perchloric acid solution [60% (m/m)] and then 65 mL isopropanol are slowly added. This solution is prepared on the day it is used.

5. Hydroxyproline, standard solutions

A stock solution is prepared by dissolving 50 mg hydroxyproline in water in a 100 mL volumetric flask. 1 drop sulphuric acid solution is added and filled up to the mark with water. This solution is stable for at least 1 month, stored at 4°C.

On the day of use, 5 mL stock solution is transferred into a 500 mL volumetric flask and filled up to the mark with water. Four standard solutions are then prepared by diluting 10 mL, 20 mL, 30 mL and 40 mL of this solution with water up to 100 ml to obtain hydroxyproline concentrations of 0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 1.5 µg/mL, and 2 µg/mL, respectively.

Equipment

- Spectrometer, suitable for use at a wavelength of 558 nm ± 2 nm, or a photoelectric colorimeter with an interference filter with maximum absorption at 558 nm ± 2 nm. Glass cells with optical path length of 10 mm are used.
- Adjustable oven at 105°C ± 2°C;
- Analytical scales with accuracy of 0.0001 g
- Adjustable water bath at 60°C

Work Method

Sample Preparation

- a. Approximately 0.5-1 g sample are weighed with an accuracy of 0.0001 g in hydrolysis tubes so that the sample does not adhere to the walls.
- b. 10 mL sulphuric acid solution (1) are added, the tube is covered and placed in the oven at 105°C ± 2°C for 16 hours for hydrolysis.

3. Cloramină-T

Se dizolvă 1,41 g sare de sodiu a N-clor-p-toluenesulfonamidă trihidrat (Cloramina-T) în 100 ml din soluția tampon. Această soluție se prepară imediat înainte de utilizare.

4. Reactiv de culoare

Se dizolvă 10,0 g p-dimetilaminobezaldehidă în 35 ml de soluție de acid percloric [60% (m/m)] și apoi se adaugă încet 65 ml de izopropanol. Această soluție se prepară în ziua utilizării.

5. Hidroxiprolină, soluții standard.

Se obține o soluție stoc prin dizolvarea a 50 mg de hidroxiprolină în apă într-un balon cotat de 100 ml. Se adaugă 1 picătură de soluție de acid sulfuric și se completează până la semn cu apă. Această soluție este stabila timp de cel puțin 1 lună, la 4°C.

În ziua de utilizare, se transferă 5 ml de soluție stoc într-un balon cotat de 500 ml și se completează până la semn cu apă. Apoi se prepară patru soluții standard prin diluarea a 10 ml, 20 ml, 30 ml și 40 ml din această soluție până la 100 ml cu apă pentru a obține concentrațiile hidroxiprolinei de 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 1,5 µg/ml și respectiv 2 µg/ml.

Aparatură

- Spectrometru, adevarat pentru utilizare la o lungime de undă de 558 nm ± 2 nm, sau un colorimetru fotoelectric cu un filtru de interferență cu un maxim de absorbție la 558 nm ± 2 nm. Se folosesc celule de sticlă cu drum optic de 10 mm.
- Etuvă reglabilă la 105°C ± 2°C;
- Balanță analitică cu acuratețea de 0,0001 g;
- Baie de apă reglabilă la 60°C.

Mod de lucru

Pregătirea probei

- a. Se cântăresc aproximativ 0,5-1 g de probă cu acuratețe de 0,0001 g în tuburi de hidroliză astfel încât proba să nu adere la pereti.
- b. Se adaugă 10 ml soluție de acid sulfuric (1), se acoperă tubul și se plasează în etuva la 105°C ± 2°C timp de 16 ore pentru hidroliza.

- c. The resulting hydrolysate is transferred into a 250 mL volumetric flask and filled with water up to the mark.
- d. Using a pipette, a volume V is added into a 250 mL volumetric flask and filled with water up to the mark. Volume V will be taken so that hydroxyproline content would range between 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and 2 $\mu\text{g/mL}$.
- e. 4.00 mL of this solution (d) is transferred into a test tube and 2.00 mL Chloramine-T reagent is added (3). The solution is stirred and left at room temperature for 20 min \pm 1 min.
- f. 2.00 mL colour reagent (4) is added, mixed thoroughly and the lid of the tube is covered with aluminium or plastic foil (5.6).
- g. The tube is rapidly transferred into the water bath (5.7), set at 60°C and heated for 20 minutes precisely.
- h. The tube is cooled under tap water stream for at least 3 minutes and left at room temperature for 30 min.
- i. Absorbance is measured at 558 nm \pm 2 nm in a glass cell compared to a blank of reagents.

Calibration Curve

The procedure described from item e. to i. included is performed on standard hydroxyproline using 4.00 ml of the four diluted solutions.

The calibration curve is plotted.

Values for analysed samples are read and concentration is calculated depending on the mass of the sample, dilutions and the sample volume V taken in item d.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Collagen biomaterials for medical use from the Collagen Department of INCntp - Division ICPI, namely collagen hydrolysates, gels and matrices used in wound treatment (Pancol, Gevicol), were studied to determine hydroxyproline [5-9].

Samples were physically-chemically characterised and the results are presented in Table 1:

- c. Hidrolizatul obtinut se transfera într-un balon cotat de 250 ml și se aduce la semn cu apa.
- d. Cu ajutorul unei pipete se introduce un volum V într-un balon cotat de 250 ml și se aduce la semn cu apă. Volumul V va fi luat astfel încât conținutul de hidroxiprolină să fie cuprins în intervalul 0,5 $\mu\text{g/ml}$ -2 $\mu\text{g/ml}$.
- e. Se transferă 4,00 ml din aceasta soluție (d) într-o eprubeta și se adaugă 2,00 ml de reactiv Cloramina-T (3). Se amesteca și se lasă la temperatură camerei timp de 20 min \pm 1 min.
- f. Se adaugă 2,00 ml reactiv de culoare (4), se amesteca bine și capacul tubului se acoperă cu aluminiu sau folie de plastic (5.6).
- g. Se transferă tubul rapid în baia de apă (5.7), stabilită la 60°C și se încalzeste timp de exact 20 de minute.
- h. Se raceste tubul sub jet de apă de la robinet timp de cel puțin 3 minute și se lasă la temperatură camerei timp de 30 min.
- i. Se măsoară absorbanta la 558 nm \pm 2 nm într-o celula de sticlă fata de un blank de reactivi.

Curba de calibrare

Se efectuează procedura descrisă de la punctul e. până la i. inclusiv, cu câte 4,00 ml din cele patru soluții diluate hidroxiprolinei standard.

Se trasează graficul de calibrare.

Se citesc valorile pentru probele luate în lucru și se calculează concentrația în funcție de masa probei, diluțiile efectuate și volumul V de probă luat la punctul d.

RESULTATE SI DISCUTII

Pentru determinarea hidroxiprolinei s-au luat în studiu biomateriale colagenice pentru uz medical de la Departamentul Colagen al INCntp – Sucursala ICPI, respectiv hidrolizate, geluri și matrici colagene folosite la tratarea plăgilor (Pancol, Gevicol) [5-9].

Probele au fost caracterizate fizico-chimic, rezultatele fiind prezentate în Tabelul 1:

Table 1: Characterization of collagen biomaterials for medical use
 Tabelul 1: Caracterizarea biomaterialelor colagenice pentru uz medical

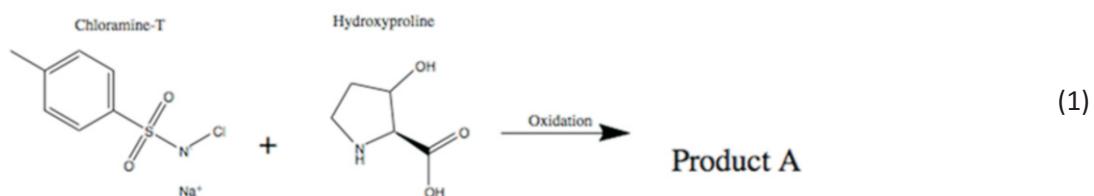
Biomaterial Biomaterial	Characteristics Caracteristici	Dry matter, % Substanță uscată, %	Ash*, % Cenușă*, %	Total nitrogen*, % Azot total*, %	Appearance Aspect
Pancol batch 2 <i>Pancol lot 2</i>		85.79	1.64	15.78	Spongious white foil <i>Folie albă spongioasă</i>
Pancol batch 3 <i>Pancol lot 3</i>		84.30	2.90	16.20	Spongious white foil <i>Folie albă spongioasă</i>
Gevicol batch 2 <i>Gevicol lot 2</i>		87.57	2.72	16.45	Spongious violet foil <i>Folie violet spongioasă</i>
Gevicol batch 3 <i>Gevicol lot 3</i>		86.52	1.46	14.80	Spongious violet foil <i>Folie violet spongioasă</i>
Collagen gel batch 2 <i>Gel colagen lot 2</i>		2.95	4.07	17.28	Transparent gel <i>Gel transparent</i>
Collagen gel batch 3 <i>Gel colagen lot 3</i>		4.43	2.48	15.08	Transparent gel <i>Gel transparent</i>
Hydrolysate COL 22 <i>Hidrolizat COL 22</i>		84.90	2.01	16.87	Yellowish powder <i>Pulbere gălbui</i>
Hydrolysate COL 23 <i>Hidrolizat COL 23</i>		85.85	1.56	17.15	Yellowish powder <i>Pulbere gălbui</i>

*values are recalculated without volatile matter

*valorile sunt recalculate la liber de materii volatile

Chloramine-T (N-chloro-4-toluenesulfonamide sodium salt) was used as oxidation agent, as its indisputable advantages include easy decomposition of its excess and absence of coloured reduction products. The oxidation reaction is performed in a buffer solution with pH~6.8.

Hydroxyproline oxidation is illustrated by the following reactions:



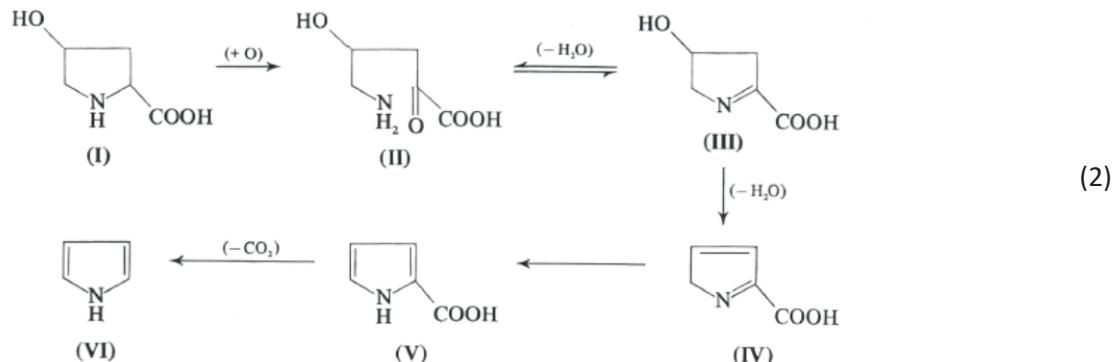
The postulated mechanism for the oxidation of hydroxyproline to pyrrole is as follows (2): first hydroxyproline (I) is oxidized to a linear compound, α -keto- γ -hydroxy- δ -aminovaleric acid (II), which is in equilibrium with the pyrroline-4-hydroxy-2-carboxylic acid with cyclic structure (III). The loss of water gives an

Cloramina-T (sarea de sodiu N-clor-4-toluensulfonamida) a fost utilizată ca agent de oxidare deoarece printre avantajele incontestabile ale acestui agent de oxidare sunt ușurința de descompunere a excesului său și absența produselor de reducere colorate. Reacția de oxidare este realizată într-o soluție tampon cu pH~6.8.

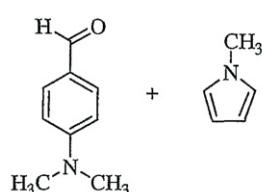
Oxidarea hidroxiprolinei este ilustrată prin reacțiile următoare:

Mecanismul postulat pentru oxidarea hidroxiprolinei la pirol este următorul (2): mai întâi hidroxiprolina (I) este oxidată la un compus liniar, acidul α -ceto- γ -hidroxi- δ -aminovaleric (II), care se află în echilibru cu acidul pirolin-4-hidroxi-2-carboxilic cu structură ciclică (III). Pierderea de apă dă o structură

unstable structure (IV), which spontaneously rearranges to pyrrole-2-carboxylic acid (V). The final step of decarboxylation to pyrrole (VI) takes place during the heating after the addition of the chromogenic reagent for pyrrole, p-dimethylaminobenzaldehyde [27].



Chromophore formation is illustrated in the following reaction:



As the products tested have a much higher collagen content, the amount of sample tested was modified. Also, as the product in question is collagen hydrolysate, we considered it necessary to use more diluted mineral acids for hydrolysis, namely 3 molar compared to the 6-12 molar used for meat and meat products. The hydrolysate filtration step was eliminated as it does not contain other components.

Both sulphuric acid 3M and hydrochloric acid 3M were used for hydrolysis of studied samples, with comparable results.

Values for hydroxyproline in collagen products for medical use determined using the adapted method are in accordance with literature data regarding hydroxyproline content. Each value is the average of 10 replicated determinations, presented in Table 2.

instabilă (IV), care se rearanjează spontan la pirol-2-carboxilic (V). Etapa finală de decarboxilare la pirol (VI) are loc în timpul încălzirii după adăugarea reactivului cromogen pentru pirol, respectiv p-dimetilaminobenzaldehida [27].

Formarea cromoforului cu este ilustrată în reacția următoare:



Pentru că produsele luate în studiu au o cantitate mult mai mare de colagen, s-a modificat cantitatea de probă luată în lucru. De asemenea, fiind vorba de hidrolizate de colagen, am considerat necesar a se utiliza pentru hidroliză acizi minerali mai diluați, respectiv 3 molar față de 6-12 molar, cât se utilizează pentru carne și produse din carne. S-a eliminat faza de filtrare a hidrolizatului deoarece nu avem alte componente.

Pentru hidroliza probelor luate în studiu s-a utilizat atât acid sulfuric 3M, cât și acid clorhidric 3M, rezultatele fiind comparabile.

Valorile pentru hidroxiprolina din produsele colagenice pentru uz medical determinate prin metodă adaptată sunt în concordanță cu datele din literatură privind conținutul de hidroxiprolină. Valorile se regăsesc în Tabelul 2, fiecare valoare reprezentând media a zece determinări replicate.

Table 2: Hydroxyproline content of collagen biomaterials for medical use
 Tabelul 2: Conținutul de hidroxiprolină al biomaterialelor colagenice pentru uz medical

Biomaterial <i>Biomaterial</i>	Pancol batch 2 <i>Pancol lot 2</i>	Pancol batch 3 <i>Pancol lot 3</i>	Gevicol batch 2 <i>Gevicol lot 2</i>	Gevicol batch 3 <i>Gevicol lot 3</i>	Collagen gel batch 2 <i>Gel colagen lot 2</i>	Collagen gel batch 3 <i>Gel colagen lot 3</i>	Hydrolysate COL 22 <i>Hidrolizat COL 22</i>	Hydrolysate COL 23 <i>Hidrolizat COL 23</i>
Hydroxyproline, % <i>Hidroxiprolină, %</i>	13.98*	14.23*	14.63*	14.55*	15.01*	15.12*	12.51*	12.77*

* values are recalculated without volatile matter

* valorile sunt recalculate la liber de materii volatile

Validation is, therefore, an important step in determining repeatability, reproducibility and safety of the method, as it confirms whether the method is suitable for use in a given system.

Throughout the validation stages of the method, several performance parameters are monitored: limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, working range, accuracy, reliability, repeatability, internal reproducibility.

The validation method and analysis procedure of hydroxyproline content were performed in accordance to EURACHEM validation guide for analytical methods.

Working range is the interval between the lower concentration and the higher concentration of the analyte in the sample for which it was proven that the procedure has the right level of precision, accuracy and linearity.

Linearity is the ability of an analytical method to yield results proportional to the concentration of the analyte in the sample.

The calibration curve of hydroxyproline was plotted in the range of 0.1-2.5 µg/mL and the linearity range for which the correlation coefficient characterizing the regression line $R^2=0.990377$ was visually assessed.

Validarea este, aşadar, o etapă importantă în determinarea repetabilității, reproductibilității și siguranței metodei, deoarece poate confirma dacă metoda este potrivită pentru a fi utilizată pentru un anumit sistem.

Pe parcursul etapelor validării metodei de analiză se urmăresc mai mulți parametri de performanță ai metodei: limita de detecție (LOD), limita de cantificare (LOQ), liniaritatea, domeniul concentrațiilor de lucru, exactitatea, fidelitatea, repetabilitatea, reproductibilitatea internă.

Metoda de validare și procedura de analiză a conținutului de hidroxiprolină s-a realizat în conformitate cu ghidurile de validare pentru metodele analitice EURACHEM.

Domeniul concentrațiilor de lucru reprezintă intervalul dintre concentrația inferioară și cea superioară a analitului din probă de analizat pentru care s-a demonstrat că procedura are un nivel potrivit de precizie, exactitate și liniaritate.

Liniaritatea reprezintă abilitatea unei metode analitice de a obține rezultate proporționale cu concentrația analitului din probă.

S-a trăsăt curba de etalonare a hidroxiprolinei pe domeniul 0,1-2,5 µg/ml și s-a examinat vizual domeniul de liniaritate pentru care s-a obținut coeficientul de corelație ce caracterizează dreapta de regresie $R^2=0,990377$.

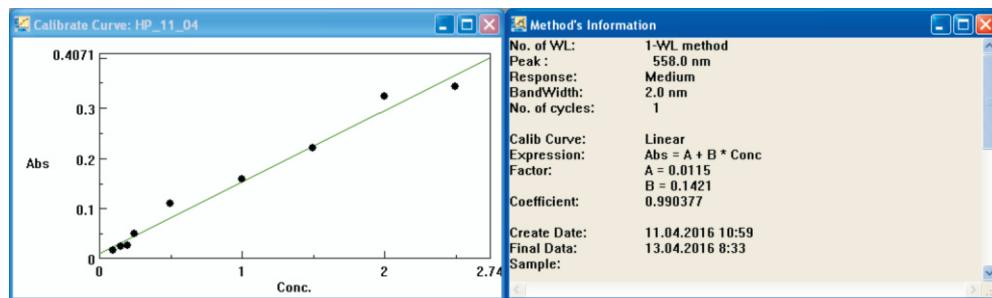


Figure 1. Linearity range for concentrations ranging between 0.1 µg/mL and 2.5 µg/mL
Figura 1. Domeniu de liniaritate pentru concentrații cuprinse între 0,1 µg/ml și 2,5 µg/ml

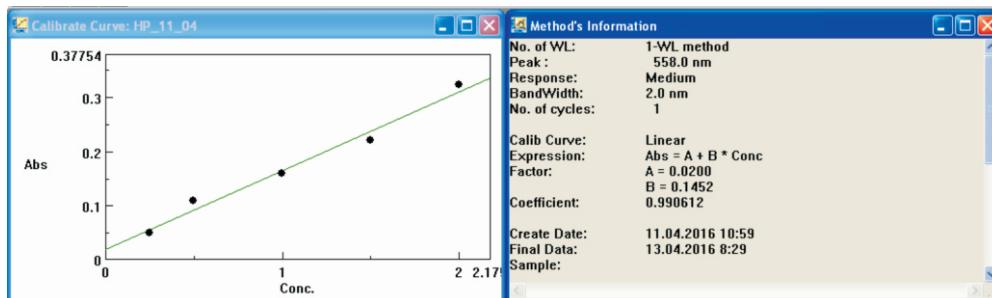


Figure 2. Linearity range for concentrations ranging between 0.5 µg/mL and 2 µg/mL
Figura 2. Domeniu de liniaritate pentru concentrații cuprinse între 0,5 µg/ml și 2 µg/ml

The equation of the linear regression function is:

Ecuația funcției de regresie liniară este de forma:

$$y = 0.1421x + 0.0115 \quad (4)$$

$$b = 0.0115 \text{ intensity units } \times \mu\text{g}^{-1}\text{l} \quad (5)$$

$$R^2 = 0.9908$$

For good linearity, the correlation coefficient characterizing the regression line must range between 0.990 and 1.

Ten replicated samples of 1.5 µg/mL hydroxyproline concentration were prepared and Y_i values were measured (integrated units) for signal intensity at 558 nm. Based on the equation of the calibration curve, X_i (µg/L) values of concentration obtained experimentally were calculated and are presented in Table 3.

Pentru o bună liniaritate, coeficientul de corelație ce caracterizează dreapta de regresie trebuie să fie cuprins între 0,990 și 1.

S-au preparat 10 probe replicate de concentrație 1,5 µg/ml hidroxiprolină și s-au măsurat valorile Y_i (unități integrate) ale intensității semnalului de la 558 nm. Pe baza ecuației curbei de etalonare s-au determinat prin calcul valorile X_i (µg/l) de concentrație obținute experimental și sunt prezentate în Tabelul 3.

Table 3: Yi and Xi values obtained for the ten analysed samples
 Tabelul 3: Valorile Yi și Xi obținute pentru cele 10 probe analizate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Yi	0.2245	0.2249	0.2246	0.2247	0.2241	0.2250	0.2255	0.2251	0.2253	0.2250
Xi	1.4877	1.4906	1.4885	1.4892	1.4848	1.4913	1.4949	1.4921	1.4935	1.4913

$$X_{\text{average}}(\text{det.}) = 1.4904 \mu\text{g/L}$$

μ = real value of the reference material

Accuracy is the closeness between the real value and the value determined in the analysed sample and is calculated using the following formula:

$$\text{Accuracy/Exactitate \%} = \frac{X_{\text{mediu}}}{\mu} \cdot 100 \quad \text{Accuracy/Exactitate} = \frac{1,4904}{1,5} = 99,36\% \quad (6)$$

$$\text{Bias \%} = \frac{X_{\text{mediu}} - \mu}{\mu} \cdot 100 \quad \text{Bias} = 0.64 \% \quad (7)$$

The performance criterion established for accuracy was to fall in the 95-105% range and the determined value is 99.36%.

Standard deviation $s=0.00295 \mu\text{g/mL}$

CV (RSD)=0.19766%

Repeatability is a measure of the scattering degree, in a confidence interval, of the results obtained from measurement performed by the same analyst, under the same working conditions.

$$X_{\text{mediu}}(\text{det.}) = 1,4904 \mu\text{g/l}$$

μ = valoarea reală a materialului de referință

Exactitatea reprezintă apropierea dintre valoarea reală și valoarea găsită în proba de analizat și se calculează cu formula:

Criteriul de performanță stabilit pentru exactitate a fost să se încadreze în intervalul 95-105% și valoarea găsită este de 99,36%.

Deviația standard $s=0,00295 \mu\text{g/ml}$

CV (RSD)=0,19766%

Repetabilitatea este o măsură a gradului de împrăștiere, într-un interval de încredere, a rezultatelor obținute în urma măsurării executate de același analist, în aceleși condiții de lucru.

$$r = 2.8 \times sr \quad (8)$$

where: sr = standard deviation of repeatability.

în care: sr = deviația standard a repetabilității.

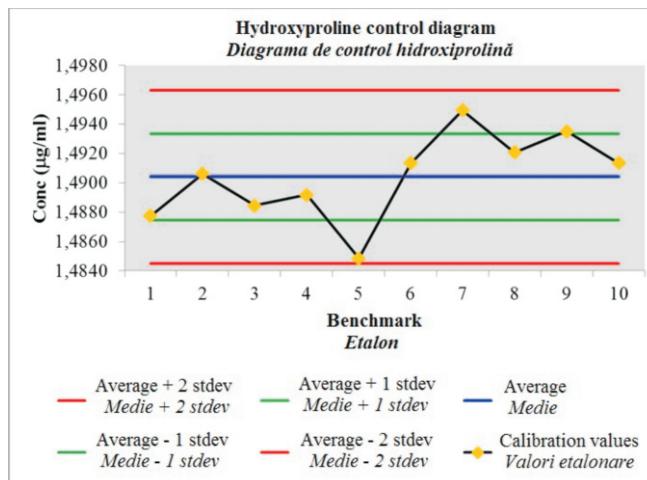


Figure 3. Hydroxyproline control diagram

Figura 3. Diagrama de control a hidroxiprolinei

The control diagram shows that eight of the replicated samples fall into the average limit + 1 standard deviation, and only two range between the average + 2 standard deviations, which means good repeatability.

We consider that the method has good repeatability, because standard deviation fell into the 0.00280-0.00298 µg/mL range.

In terms of internal reproducibility, replicated determinations were performed on the same analyte, under the same conditions imposed by the method, by the same analyst, on different days and the following were calculated for each determination: average, standard deviation, relative standard deviation (RSD).

Din diagrama de control se observă că 8 dintre probele replicate se încadrează în limita medie + 1 deviație standard și doar două sunt cuprinse în medie + 2 deviații standard, ceea ce reprezintă o bună repetabilitate.

Considerăm că metoda are o bună repetabilitate deoarece deviația standard s-a încadrat în intervalul 0,00280-0,00298 µg/ml.

În ceea ce privește reproductibilitatea internă, s-au realizat determinări replicate pe același analit, în aceleași condiții impuse de metodă, de același analist, în zile diferite și s-au calculat pentru fiecare determinare: media, deviația standard, deviația standard relativă (RSD).

$$RL = 2,8 \times 1,6 \times sr = 1,6 \times r \quad (9)$$

where:

sr = standard deviation of repeatability

r = repeatability

Ten repeated analyses of samples with the concentration of 1.5 µg/L hydroxyproline were performed within ten days and Y_i values of signal intensity at 558 nm were measured. Based on the equation of the calibration curve, X_i values of concentration experimentally obtained were calculated.

în care:

sr = deviația standard a repetabilității

r = repetabilitatea

S-au efectuat 10 analize repetitive ale probelor de concentrație 1,5 µg/ml hidroxiprolină în intervalul a zece zile și s-au măsurat valorile Y_i ale intensității semnalului de la 558 nm. Pe baza ecuației curbei de etalonare s-au determinat prin calcul valorile X_i de concentrație obținute experimental.

Table 4: Y_i and X_i values obtained for the ten analysed samples
Tabelul 4: Valorile Y_i și X_i obținute pentru cele 10 probe analizate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Y_i	0.2350	0.2354	0.2358	0.2380	0.2345	0.2367	0.2366	0.2342	0.2370	0.2368
X_i	1.4789	1.4905	1.4933	1.5082	1.4845	1.4913	1.4949	1.4921	1.4935	1.4913

$$X_{\text{average}}(\text{det.}) = 1.4946 \mu\text{g/L}$$

$$s=0.008279 \mu\text{g/mL}$$

$$R=1,6 \times 0,008279 = 0,013246 \mu\text{g/mL}$$

$$RSR=0,8863\%$$

For tested concentrations, $R > r$ and within the permissible limits.

From the calculation of performance parameters of the studied method, the following are noted:

- The linearity range of the method was between 0.5-2 µg/mL, interval where the value of the

$$X_{\text{mediu}}(\text{det.}) = 1,4946 \mu\text{g/l}$$

$$s=0,008279 \mu\text{g/ml}$$

$$R=1,6 \times 0,008279 = 0,013246 \mu\text{g/ml}$$

$$RSR=0,8863\%$$

Pentru concentrațiile testate, $R > r$ și este situat în limitele admise.

Din calculul parametrilor de performanță ai metodei studiate se observă următoarele:

- Domeniul de liniaritate al metodei este cuprins între 0,5-2 µg/ml, interval în care valoarea

correlation coefficient was 0.9906;

- If one takes into account smaller concentrations, the value of the correlation coefficient is 0.9903;
- Limit of detection was set for a concentration of 0.1088 µg/mL;
- Limit of quantification was set for a concentration of 0.1295 µg/mL;
- Accuracy is 99.36% and represents closeness between the real value and the determined value in the analysed sample;
- Standard deviation value is 0.00285 µg/mL.

CONCLUSIONS

The paper presents a method for determination of hydroxyproline in protein biomaterials for medical use.

The method was validated in order to establish performance parameters and check compliance to the set purpose by determining: linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy and reliability of the method.

The method was checked to ensure repeatability and reproducibility and is supported by determinations on collagen products for medical use – hydrolysates, gels, spongyous matrices – from the Collagen Department of INCDTP – Division ICPI.

Acknowledgements

This study was funded by ANCSI within “Nucleu” Program 2016 – 2017, project code PN 16 34 04 04, Contract 26/14.03.2016.

REFERENCES

1. Albu, M.G., Titorencu, I., Chelaru, C., The stability of some collagen hydrogels, *Revista de Pielărie Încălțăminte (Leather and Footwear Journal)*, **2011**, 11, 1, 11-20.
2. Albu, M.G., Titorencu, I., Biocompatibility study of collagen nerve conductors, *Revista de Pielărie Încălțăminte (Leather and Footwear Journal)*, **2011**, 11, 4, 329-340.

coefficientul de corelație a fost 0,9906;

- Dacă se iau în calcul și concentrațiile mai mici, valoarea coeficientului de corelație este 0,9903;
- Limita de detecție a fost stabilită pentru o concentrație de 0,1088 µg/ml;
- Limita de cuantificare a fost stabilită pentru o concentrație de 0,1295 µg/ml;
- Exactitatea este de 99,36% și reprezintă apropierea dintre valoarea reală și valoarea găsită în probă de analizat;
- Deviația standard are valoarea de 0,00285 µg/ml.

CONCLUZII

Lucrarea prezintă o metodă de determinare a hidroxiprolinei din biomateriale proteice de uz medical.

Metoda a fost validată pentru a se stabili parametrii de performanță și pentru verificarea conformării cu scopul propus prin determinarea: liniarității, limitei de detecție, limitei de cuantificare, exactitatea și fidelitatea metodei.

Metoda a fost verificată pentru a se asigura repetitivitatea și reproductibilitatea și este susținută de determinări pe produse colagenice de uz medical – hidrolizate, geluri, matrice spongioase – provenite din Departamentul de Colagen al INCDTP – Sucursala ICPI.

Mulțumiri

Acest studiu a fost finanțat de ANCSI în cadrul Programului Nucleu 2016 – 2017, cod proiect PN 16 34 04 04, Contract 26/14.03.2016.

3. Albu, M.G., Ghica, M.V., Tang, K., Liu, J., Coara, Gh., Rheological behavior of some collagen extracts, *Revista de Pielarie Încăltămintă (Leather and Footwear Journal)*, **2012**, 12, 3, 193-200.
4. Vraneanu, M.D., Saban, R., Albu, M.G., Antoniac, I., Preparation and characterization of collagen: amorphous calcium phosphate composites, *Revista de Pielarie Încăltămintă (Leather and Footwear Journal)*, **2012**, 12, 3, 215-222.
5. Albu, M.G., Leca, M., Trandafir, V., Rheological behaviour of some collagen creams, *Revista de Pielarie Încăltămintă (Leather and Footwear Journal)*, **2012**, 12, 4, 257-270.
6. Albu, M.G., Deselnicu, V., Ioannidis, I., Deselnicu, D.C., Chelaru, C., Chemical functionalization and stabilization of type I collagen with organic tanning agents, *Korean J Chem Eng*, **2015**, 32, 2, 354-361, DOI: 10.1007/s11814-014-0197-x.
7. Albu, M.G., Trandafir, V., Leca, M., Carsote, C., Characterization of collagen-gentamicin systems used in controlled release of drugs, *Revista de Pielarie Încăltămintă (Leather and Footwear Journal)*, **2007**, 4, 3-9.
8. Albu, M.G., Ficai, A., Lungu, A., Preparation and characterization of collagen matrices obtained at different freezing temperatures, *Revista de Pielarie Încăltămintă (Leather and Footwear Journal)*, **2010**, 10, 3, 39-50.
9. Shoulders, M.D., Raines, R.T., Collagen structure and stability, *Annu Rev Biochem*, **2009**, 78, 929–958.
10. Bhattacharjee, A., Bansal, M., Collagen Structure: The Madras Triple Helix and the Current Scenario, *Life*, **2005**, 57, 3, 161-172.
11. International Standards Organisation, Methods of Test for Meat and Meat Products. Part II. Determination of L(-)hydroxyproline Content, ISO 3496: **1994**.
12. Mee, J.M.L., Specific assay of hydroxyproline by gas chromatography, *J Chromatog*, **1973**, 87, 155-161.
13. Pefier, C., Ronziere, M.C., Rattner, A., Frey, J., Employment of gas liquid chromatography for the analysis of collagen amino acids in biopsy tissue, *J Chromatog*, **1980**, 182, 155-162.
14. Afkhami, A. Madrakian, T., Maleki, A., Indirect Kinetic Spectrophotometric Determination of Hydroxylamine Based on Its Reaction with Iodate, *Anal Scien*, Feb. **2006**, 22, 329-331.
15. Qi, X., Baldwin, R.P., Liquid chromatography/electrochemical detection of hydroxylamines by oxidation at a cobalt phthalocyanine chemically modified electrode, *Electroanal*, **1994**, 6, 5-6, 353–360.
16. Partridge, S.M., Elsden, D.F., Rapid methods for the determination of glucosamine, galactosamine and hydroxyproline, *Biochem J*, **1961**, 80, 34.
17. Mussini, E., Marcucci, F., Separation of prolines and hydroxyprolines by gas chromatography, *J Chromatog*, **1965**, 20, 266-269.
18. MacKenzie, S.L., Tenaschuk, D., Analysis of hydroxyproline and hydroxylysine: improved gas chromatographic method, *J Chromatog*, **1975**, 104, 176-177.
19. Woessner, J.F., Woessner, J.R., *Arch Biochem Biophys*, **1961**, 93, 440.
20. Bergman, I., Loxley, R., *Anal Chem*, **1970**, 42, 703.
21. Ignat'eva, N.Yu., Danilov, N.A., Averkiev, S.V., Obrezkova, M.V., Lunin, V.V., Sobol, E.N., Determination of Hydroxyproline in Tissues and the Evaluation of the Collagen Content of the Tissues, *J Anal Chem*, **2007**, 62, 1, 51–57.
22. Carlson, C.G., Determination of hydroxyproline content as a measure of fibrosis in nondystrophic and dystrophic skeletal muscle, Wellstone Muscular Dystrophy Center Washinton, DC, **2014**, 1-10.
23. AOAC International, in P. Cunniff (ed.), Official methods of analysis of AOAC international, **1996**, 16th ed., 39.1–39.6, Gaithersburg, MD: AOAC International.
24. <http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/hydroxyproline-assay-kit-mak008.html> 2016
25. <http://www.scientistsolutions.com/forum/biochemistry-assay-development-protocols/hydroxyproline-assay>

26. CEN/TC 289/WG 1 - NWIP Leather - Chemical tests - Determination of the designation "leatherboard" by a gravimetric method - determination of hydroxyproline in leather fiberboard - draft **2012**.
 27. Etherington, D.J., Sims, T.J., Detection and Estimation of Collagen, *J Sci Food Agric*, **1981**, 32, 539-546.
-

Article received/Data primirii articolului: 26.05.2016

Accepted/Acceptat la data: 14.06.2016