

CV _r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S _R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV _R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Výtěžnost [%]	90,0	93,3	87,2	80,2
s _r =	standardní odchylka opakovatelnosti			
CV _r =	variační koeficient opakovatelnosti v %			
S _R =	standardní odchylka reprodukovatelnosti			
CV _R =	variační koeficient reprodukovatelnosti v %			

F) STANOVENÍ OBSAHU DIKLAZURILU

2,6-dichlor-alfa-(4-chlorfenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)yl)benzenacetonitril

Obsah diklazurilu se stanoví takto:

- metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidistatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidistatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo
- vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (HPLC) s ternárním gradientem a UV detekcí, jak je popsáno v bodech 1 až 9 níže.

1. Účel a oblast použití

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu diklazurilu v krmných směsích a premixech ⁽⁹⁾. Mez detekce je 0,1 mg/kg, mez stanovitelnosti 0,5 mg/kg. Nižší meze stanovitelnosti jsou dosažitelné, ale uživatel je musí validovat.

2. Princip

Po přidání vnitřního standardu se vzorek extrahuje okyseleným methanolem. U krmiv se alikvotní část extraktu přečistí na SPE patroně C18. Diklazuril se z patrony eluuje směsí okyseleného methanolu a vody. Po odpaření se zbytek rozpustí v roztoku DMF/voda. U premixů se extrakt odpaří a zbytek se rozpustí v roztoku DMF/voda. Obsah diklazurilu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s ternárním gradientem a UV detekcí.

3. Činidla

- 3.1. Voda, pro HPLC
- 3.2. Octan amonný
- 3.3. Tetrabutylamonium-hydrogensíran (TBHS)
- 3.4. Acetonitril, pro HPLC
- 3.5. Methanol, pro HPLC
- 3.6. N,N-dimethylformamid (DMF)
- 3.7. Kyselina chlorovodíková, ρ₂₀ = 1,19 g/ml
- 3.8. Standardní látka: diklazuril:
2,6-dichlor-alfa-(4-chlorfenyl)-4-(4,5-dihydro- 3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)yl)benzenacetonitril
s deklarovanou čistotou

⁽⁹⁾ Tuto metoda lze použít i pro stanovení diklazurilu v krmných surovinách.

3.8.1. Zásobní standardní roztok diklazurilu, 500 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se naváží 25 mg diklazurilu (bod 3.8) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (bod 3.6), doplní se DMF (bod 3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ stálý jeden měsíc ⁽¹⁰⁾.

3.8.2. Standardní roztok diklazurilu, 50 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se převede 5,00 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.8.1), doplní se DMF (bod 3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ stálý jeden měsíc.

3.9. Vnitřní standard:
2,6-dichlor- α -(4-chlorfenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)-yl)- α -methylbenzenacetonitril
(methyldiklazuril)

3.9.1. Zásobní roztok vnitřního standardu, 500 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se naváží 25 mg vnitřního standardu (bod 3.9) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (bod 3.6), doplní se DMF (bod 3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ stálý jeden měsíc.

3.9.2. Roztok vnitřního standardu, 50 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se převede 5,00 ml zásobního roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.1), doplní se DMF (bod 3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ stálý jeden měsíc.

3.9.3. Roztok vnitřního standardu pro premixy, p/1 000 mg/ml (p = nominální obsah diklazurilu v premixu v mg/kg)

Do 100 ml odměrné baňky se naváží p/10 mg vnitřního standardu s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (bod 3.6) v ultrazvukové lázni (bod 4.7), doplní DMF po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ stálý jeden měsíc.

3.10. Kalibrační roztoky

3.10.1. Kalibrační roztok, 1 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetuje 1,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 17 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.10.2. Kalibrační roztok, 2 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetují 2,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 16 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.10.3. Kalibrační roztok, 3 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetují 3,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 15 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

⁽¹⁰⁾ Delší stabilita (až 1 rok) je možná, ale musí ji potvrdit konkrétní laboratoř.

3.10.4. Kalibrační roztok, 4 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetují 4,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 14 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.10.5. Kalibrační roztok, 5 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetuje 5,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 13 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

Poznámka: kalibrační roztoky (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) pokrývají koncentraci diklazurilu v krmivu v rozmezí od 0,5 mg/kg do 2,5 mg/kg při použití stávajícího protokolu.

3.11. SPE patrona C₁₈, např. Mega Bond Elut, velikost: 20 ml, sorpční hmotnost: 5 000 mg (stabilizace podle pokynů dodavatele).

3.12. Extrakční rozpouštědlo: okyselený methanol.

Do 1 000 ml methanolu (bod 3.5) se napipetuje 5,0 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.7) a promíchá.

3.13. Mobilní fáze pro HPLC

3.13.1. Eluent A: roztok octanu amonného a tetrabutylamonium-hydrogensíranu.

5 g octanu amonného (bod 3.2) a 3,4 g TBHS (bod 3.3) se rozpustí v 1 000 ml vody (bod 3.1) a promíchá se.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (bod 3.4).

3.13.3. Eluent C: methanol (bod 3.5).

4. **Přístroje**

4.1. Mechanická třepačka

4.2. Zařízení pro HPLC s ternárním gradientem:

4.2.1. Kolona pro kapalinovou chromatografii, Hypersil ODS, náplň 3 µm, 100 mm × 4,6 mm, nebo obdobná

4.2.2. UV detektor s nastavitelnou vlnovou délkou nebo detektor s diodovým polem

4.3. Rotační filmová odparka

4.4. Membránový filtr (např. chemicky odolný Nylon), 0,45 µm

4.5. Jednorázová injekční stříkačka, 5 ml

4.6. Vakuové zařízení

4.7. Ultrazvuková lázeň

5. **Postup**5.1. *Obecně*

5.1.1. Slepý vzorek krmiva

Provede se analýza pro kontrolu toho, že slepý vzorek krmiva neobsahuje ani diklazuril, ani jiné rušivé látky. Slepý vzorek krmiva musí mít podobné složení jako vzorek a při analýze nesmí být zjištěn diklazuril ani jiné rušivé látky.

5.1.2. Zkouška na výtěžnost

Provede se zkouška na výtěžnost u slepého vzorku krmiva, který byl obohacen přidáním takového množství diklazurilu, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Pro obohacení na obsah 1 mg/kg se k 50 g slepého vzorku krmiva přidá 0,1 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.8.1). Důkladně se promíchá a vyčká 10 minut, znovu se několikrát promíchá a potom se se může začít s extrakcí (bod 5.2).

Není-li k dispozici slepý vzorek krmiva podobného složení jako vzorek (viz bod 5.1.1), lze provést zkoušku na výtěžnost metodou standardního přídávku. V tom případě se vzorek, jenž má být analyzován, obohatí přidáním takového množství diklazurilu, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Obohacený vzorek se potom zkouší společně se vzorkem neobohaceným a výtěžnost se vypočte odečtením.

5.2. Extrakce

5.2.1. Krmné směsi

Do 500 ml kónické baňky se naváží přibližně 50 g vzorku s přesností na 0,01 g. Přidá se 1,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2) a 200 ml extrakčního rozpouštědla (bod 3.12) a baňka se zazátkuje. Směs se přes noc třepe na třepačce (bod 4.1). Poté se nechá 10 minut usadit. 20 ml supernatantu se převede do vhodné skleněné nádoby a zředí se 20 ml vody (bod 3.1). Tento roztok se nanese na extrakční patronu (bod 3.11) a prosaje se pomocí vakua (bod 4.6). Patrona se promyje 25 ml směsí složené z extrakčního rozpouštědla (bod 3.12) a vody (bod 3.1), 65 + 35 (V + V). Spojené frakce se odstraní a složky se eluují 25 ml směsí složené z extrakčního rozpouštědla (bod 3.12) a vody, 80 + 20 (V + V). Tato frakce se v rotační odparce (bod 4.3) odpaří při 60 °C do sucha. Odparek se rozpustí v 1,0 ml DMF (bod 3.6), přidá se 1,5 ml vody (bod 3.1) a promíchá. Přefiltruje se přes membránový filtr (bod 4.4), který je připevněn k jednorázové injekční stříkačce (bod 4.5). Dále se pokračuje se stanovením HPLC (bod 5.3).

5.2.2. Premixy

Do 500 ml kónické baňky se naváží přibližně 1 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 1,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.3) a 200 ml extrakčního rozpouštědla (bod 3.12) a baňka se zazátkuje. Směs se přes noc třepe na třepačce (bod 4.1). Poté se nechá 10 minut usadit. 10 000/p ml (p = nominální obsah diklazurilu v premixu v mg/kg) supernatantu se převede do baňky s kulatým dnem vhodné velikosti. V rotační odparce (bod 4.3) se odpaří za sníženého tlaku při 60 °C do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml DMF (bod 3.6), přidá se 15,0 ml vody (bod 3.1) a promíchá. Dále se pokračuje se stanovením HPLC (bod 5.3).

5.3. Stanovení HPLC

5.3.1. Parametry

Následující podmínky jsou doporučeny, lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné nebo lepší výsledky.

- Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, náplň 3 µm, nebo obdobná.
- Mobilní fáze
 - Eluent A (bod 3.13.1): vodný roztok octanu amonného a tetrabutylamonium-hydrogensíranu.
 - Eluent B (bod 3.13.2): acetonitril.
 - Eluent C (bod 3.13.3): methanol.
- Druh eluce – lineární gradientová eluce
 - výchozí podmínky: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V),
 - po 10 minutách gradientová eluce po dobu 30 minut do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V),
 - 10 minut proplachovat eluentem B.
- Průtok: 1,5–2 ml/min.

- Objem nástřiku: 20 µl.
- Vlnová délka detektoru: 280 nm.

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (bod 3.10.2), který obsahuje 2 µg/ml diklazurilu, a vnitřního standardu, dokud se nedosáhne konstantních výšek píků a konstantních retenčních časů.

5.3.2. Chromatografická analýza kalibračních roztoků

Dvakrát se nastříkne 20 µl kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5), stanoví se a integrují píky diklazurilu a vnitřního standardu a sestojí se kalibrační křivka na základě poměru průměrné hodnoty výšky (plochy) píku diklazurilu k průměrné hodnotě výšky (plochy) píku vnitřního standardu vůči koncentraci diklazurilu v kalibračních roztocích (µg/ml).

5.3.3. Chromatografická analýza roztoků vzorku

Dvakrát se nastříkne 20 µl roztoku vzorku (bod 5.2.1 nebo 5.2.2) a stanoví se průměrná hodnota výšky (plochy) píku diklazurilu a vnitřního standardu.

6. Výpočet výsledků

6.1. Krmné směsi

Obsah diklazurilu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

$$w = \frac{\frac{Výška(d,s)}{Výška(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ nebo } w = \frac{\frac{Plocha(d,s)}{Plocha(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

kde:

- Výška(d,s) je výška píku diklazurilu v roztoku vzorku (bod 5.2.1)
- Plocha(d,s) je plocha píku diklazurilu v roztoku vzorku (bod 5.2.1)
- Výška(i,s) je výška píku vnitřního standardu v roztoku vzorku (bod 5.2.1)
- Plocha(i,s) je plocha píku vnitřního standardu v roztoku vzorku (bod 5.2.1)
- b je průsečík kalibrační křivky vynesené z kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) podle bodu 5.3.2
- a je sklon kalibrační křivky vynesené z kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) podle bodu 5.3.2
- m je hmotnost navážky vzorku v g
- V je konečný objem extraktu vzorku po opětovném rozpuštění podle bodu 5.2.1 v ml (tj. 2,5 ml)

6.2. Premixy

Obsah diklazurilu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

$$w = \frac{\frac{Výška(d,s)}{Výška(i,s)} - b}{a} \times \frac{0,02V}{m} \times p \text{ nebo } w = \frac{\frac{Plocha(d,s)}{Plocha(i,s)} - b}{a} \times \frac{0,02V}{m} \times p$$

kde:

- Výška(d,s) je výška píku diklazurilu v roztoku vzorku (bod 5.2.2)
- Plocha(d,s) je plocha píku diklazurilu v roztoku vzorku (bod 5.2.2)
- Výška(i,s) je výška píku vnitřního standardu v roztoku vzorku (bod 5.2.2)
- Plocha(i,s) je plocha píku vnitřního standardu v roztoku vzorku (bod 5.2.2)

- *b* je průsečík kalibrační křivky vynesené z kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) podle bodu 5.3.2
- *a* je sklon kalibrační křivky vynesené z kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) podle bodu 5.3.2
- *m* je hmotnost navážky vzorku v g
- *V* je konečný objem extraktu vzorku po opětovném rozpuštění podle bodu 5.2.2 v ml (tj. 25 ml)
- *p* je nominální obsah diklazurilu v premixu v mg/kg

7. Ověření výsledků

7.1. Identita

Identitu analytu lze potvrdit simultánní chromatografií nebo využitím detektoru s diodovým polem, přičemž se porovnávají spektra extraktu vzorku (bod 5.2.1 nebo 5.2.2) a kalibračního roztoku (bod 3.10.2).

7.1.1. Simultánní chromatografie

Extrakt vzorku (bod 5.2.1 nebo 5.2.2) je obohacen přidáním vhodného množství kalibračního roztoku (bod 3.10.2). Přidané množství diklazurilu musí odpovídat obsahu diklazurilu v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku diklazurilu a píku vnitřního standardu, a to úměrně přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině výšky se smí odchýlovat od šířky původního píku diklazurilu nebo píku interního standardu v neobohaceném extraktu vzorku nejvýše o $\pm 10\%$.

7.1.2. Detektor s diodovým polem

Výsledky jsou posuzovány podle těchto kritérií:

- a) Při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s přesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor s diodovým polem se udává obvykle ± 2 nm.
- b) Při vlnové délce mezi 230 a 320 nm se nesmí záznam spektra ve vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10–100 % relativní absorpance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže v žádném sledovaném bodě odchylka mezi dvěma spektry nepřesahuje 15 % absorpance standardního analytu.
- c) Při vlnové délce mezi 230 a 320 nm se nesmí spektrum vzestupné části, vrcholu a sestupné části píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10–100 % relativní absorpance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje nikde 15 % absorpance spektra ve vrcholu píku.

Jestliže některé z těchto kritérií není splněno, přítomnost analytu není potvrzena.

7.2. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou nezávislých měření provedených u dvou podvzorků nesmí překročit:

- 30 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu diklazurilu mezi 0,5 mg/kg a 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg u obsahu diklazurilu mezi 2,5 mg/kg a 5 mg/kg,
- 15 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu diklazurilu nad 5 mg/kg.

7.3. Výtěžnost

Výtěžnost u obohaceného (slepého) vzorku musí činit nejméně 80 %.

8. Výsledky kolaborativní studie

Byly provedeny dvě kolaborativní studie. V první studii provedené jinou skupinou laboratoří v roce 1994 byly analyzovány vzorky dva premixy (O 100, A 100) a tři vzorky doplňkového krmiva pro drůbež (L1, Z1, K1). Jeden vzorek premixu byl smísen s organickou matricí (O 100) a druhý s anorganickou matricí (A 100). Teoretický obsah diklazurilu je 100 mg/kg. Laboratoře byly pověřeny, aby každý ze vzorků podrobily jedné nebo dvěma analýzám. (Podrobnější údaje o první kolaborativní studii viz Journal of AOAC International, svazek 77, č. 6, 1994, s. 1359–1361).

Ve druhé kolaborativní studii byly analyzovány tři krmné směsi pro drůbež obsahující diklazuril v koncentracích 0,9 mg/kg (MAT 1) a 1,5 mg/kg (MAT 2) a slepý vzorek krmiva (MAT 3). Podrobné údaje o druhé studii viz Technická zpráva Společného výzkumného střediska (2016) a Journal of AOAC International, svazek 102, č. 2, 2019, s. 646–652. Výsledky obou kolaborativních studií jsou uvedeny v následující tabulce.

	Vzorek 1 A 100	Vzorek 2O 100	Vzorek 3 L1	Vzorek 4 Z1	Vzorek 5 K1	Vzorek 6 MAT 1	Vzorek 7 MAT 2	Vzorek 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Průměr (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	<LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	–
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	–
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	–
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	–
Nominální obsah (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	–
Odkaz (*)	První studie z roku 1994	První studie z roku 1994	První studie z roku 1994	První studie z roku 1994	První studie z roku 1994	Druhá studie z roku 2015	Druhá studie z roku 2015	Druhá studie z roku 2015

L= počet laboratoří

n= počet jednotlivých hodnot

S_r = standardní odchylka opakovatelnosti

CV_r = variační koeficient opakovatelnosti

S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti

LOQ= mez stanovitelnosti

(*) První studie z roku 1994: Journal of AOAC International, svazek 77, č. 6, 1994, s. 1359–1361; druhá studie z roku 2015: Technická zpráva Společného výzkumného střediska „Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study“ (2016).

9. Obecné poznámky

Musí být předem prokázáno, že odezva diklazurilu je měřena v lineární oblasti koncentrace.

Alespoň pro analýzu diklazurilu v krmných směsích s vysokým obsahem tuku (pro tento účel vyšším než 12 % tuku) lze tuto metodu analýzy nahradit jinými metodami založenými na HPLC, např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS), pokud má tato alternativní metoda rovnocenné charakteristiky účinnosti (výťažnost, preciznost za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti).