สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ และสรุปผล

การตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธี HPLC จะต้องผ่านขั้นตอนการแยกมอร์ฟีนจากปัสสาวะเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ก่อน ในการวิจัยนี้แยกมอร์ฟีนจากปัสสาวะด้วยเรซินชนิด โดเวกซ์ 50 ดับบลิว ก่อนนำมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย เนื่องจากมอร์ฟีนเป็นเบสอินทรีย์ (Organic base) ที่มี พีเคเอ (pKa) เท่ากับ 9.85 เมื่ออยู่ในร่างกายหรือในปัสสาวะซึ่งมีพีเอช 7.4 มอร์ฟีนประมาณร้อยละ 97-99 จะสามารถรับโปรตอนได้ (83) โมเลกุลของมอร์ฟีนจึงมีอิออนประจุบวก ดังนั้นเมื่อผ่านปัสสาวะที่มีมอร์ฟีนลงในเรซิน จะเกิดการแลกเปลี่ยนอิออนระหว่างอิออนประจุบวกของมอร์ฟีน กับโซเดียมอิออนของเรซิน มอร์ฟีนจะถูกจับอยู่บนเรซิน ส่วนโซเดียมอิออนจะละลายอยู่ในปัสสาวะผ่านออกไปจากคอลัมน์ สามารถใช้น้ำล้างสารต่าง ๆ ที่ปะปนมากับปัสสาวะให้ออกไปจากคอลัมน์โดยมอร์ฟีนยังถูกจับอยู่กับเรซิน จากนั้นจึงใช้ตัวล้างดูดซับ คือ 6 นอร์มัลสารละลายกรดเกลือ : เอธิล-แอลกอฮอล์ (1:1) 6 มิลลิลิตร ตามด้วย เอธิลแอลกอฮอล์ 20 มิลลิลิตร ชะมอร์ฟีนออกจากคอลัมน์ นำตัวล้างดูดซับที่ผ่านออกจากคอลัมน์แต่ละครั้งรวมกัน แล้วทำให้เป็นด่างที่พีเอช 8.5 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งทดลองแล้วว่าการทำให้เป็นด่าง ที่พีเอช 8.5 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายให้ประสิทธิภาพในการสกัดแยกมอร์ฟีนออกจากสารละลายได้ดี (ตารางที่ 4 หน้า 54) จากนั้นนำมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย คือ คลอโรฟอร์ม : ไอโสโพรพานอล (3 :1) เมื่อตัวทำละลายที่สกัดมอร์ฟีนออกมานี้ระเหยแห้ง จึงละลายสิ่งที่ตกค้างด้วยเมทธานอล และนำมาตรวจปริมาณด้วย HPLC จะได้เปอร์เซ็นต์ที่ได้สารคืนของมอร์ฟีนเฉลี่ย 87.31% ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.16% (ตารางที่ 5) หน้า 55) ในการวิจัยนี้จึงใช้วิธีนี้เป็นขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์ในการตรวจปริมาณมอร์ฟีนจากปัสสาวะผู้ป่วยที่เสพติดเฮโรอีนด้วยวิธี HPLC

พีเอชของสารละลายซึ่งมีมอร์ฟีน ที่จะนำมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย มีความสำคัญ

ต่อเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการสกัดมาก พบว่า พีเอชที่เหมาะสมของสารละลายขณะสกัดด้วยตัวทำละลายคือ 8-9 มีรานงานการใช้ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งอิ่มตัวด้วยเกลือต่าง ๆ เช่น โซเดียมไบคาร์บอเนต แอมโมเนียมคาร์บอเนต เป็นต้น ในการทำให้เป็นด่าง โดยเกลือเหล่านี้จะช่วยให้ประสิทธิภาพในการสกัดมอร์ฟีนจากสารละลายได้ดีขึ้น (82) อย่างไรก็ตามในการวิจัยนี้ ตัวล้างดูดซับที่ชะมอร์ฟีนออกมาจากคอลัมน์ และจะนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย มีกรดเกลือความเข้มข้นสูง การเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่มีเกลือของไบคาร์บอเนตหรือคาร์บอเนต จะเกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มาก ทำให้สารละลายฟู่กระเด็น แม้ว่าจะเติมอย่างช้า ๆ และระมัดระวังก็ตาม จากการทดลองทำให้เป็นด่างด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียว (81) ก็ทำให้เปอร์เซ็นต์ในการสกัดแยกมอร์ฟีนจากสารละลายที่ดีเช่นกัน ส่วนการทำให้เป็นด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เปอร์เซ็นต์การสกัดแยกมอร์ฟีนจากสารละลายไม่ดี (ตารางที่ 4 หน้า 54) เนื่องจากโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างแก่ แตกตัวได้ดีมาก และสามารถรับโปรตอนได้ดี ทำให้โครงสร้างของมอร์ฟีนส่วนที่เป็นฟีนอล (Phenol) แตกตัวเป็นอิออน ซึ่งมีคุณสมบัติละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ เปอร์เซ็นต์ในการสกัดแยกมอร์ฟีนจากสารละลายจึงน้อยกว่า การใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ซึ่งเป็นด่างอ่อน แตกตัวได้น้อย ในการวิจัยนี้จึงใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ปรับความเป็นด่างของสารละลายมอร์ฟีน ให้ได้พีเอช 8.5 ในการสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย หลังจากที่นำตัวอย่างปัสสาวะผ่าน โดเวกซ์ 50 ดับบลิว แล้ว

เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีน โดยวิธี HPLC ระหว่างปริมาณมอร์ฟีนที่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC กับความสูงของพีคที่วัดได้ จะได้กราฟเส้นตรง แสดงว่า ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของมอร์ฟีนที่ผู้วิจัยทำการทดลอง ความสูงของพีคที่วัดได้ เป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณของมอร์ฟีน ในการวิจัยครั้งนี้จึงหาปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธี HPLC ด้วยการใช้ความสูงของพีคที่วัดได้ เทียบกับ ความสูงของพีคของมอร์ฟีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณ

กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะคนปกติ กับการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง ในช่วง 40 วินาที (ΔA) โดยวิธี EMIT เมื่อความเข้มข้นของมอร์ฟีนตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นกราฟเส้นโค้ง (Sigmoid curve) โดย ΔA จะเปลี่ยนแปลงน้อยมากหรือไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อความเข้มข้นของมอร์ฟีนเกินกว่า 5.0

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของมอร์ฟีนตั้งแต่ 0 - 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับ ΔA เท่ากับ 0.8086 ด้วยระดับนัยสำคัญ .10 ในการวิจัยนี้ใช้วิธีวิเคราะห์ และน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Syva ในการวิเคราะห์มอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะเพื่อเปรียบเทียบกับวิธี HPLC วิธีวิเคราะห์ของบริษัท Syva ใช้สารละลายมาตรฐานของมอร์ฟีน 3 ความเข้มข้น คือ 0.0, 0.3 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการสร้างกราฟมาตรฐานเส้นตรง เพื่อใช้ในการเทียบหาปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะโดยประมาณ (Semi-quantitative) ในช่วงความเข้มข้นของมอร์ฟีนระหว่าง 0.3 - 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกำหนดให้ตัวอย่างที่อ่านผลได้ความเข้มข้นของมอร์ฟีนสูงกว่า 0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้แปรผลการวิเคราะห์เป็นบวก (positive) ตัวอย่างที่อ่านผลได้ความเข้มข้นของมอร์ฟีนต่ำกว่า 0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้แปรผลการวิเคราะห์เป็นลบ (Negative) ตัวอย่างปัสสาวะใดที่มีความเข้มข้นของมอร์ฟีนเกินกว่า 5.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้แปรผลการวิเคราะห์ว่า ความเข้มข้นเกินกว่า 5.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบว่ามีข้อแนะนำของบริษัทให้เจือจางตัวอย่างปัสสาวะเพื่อให้ความเข้มข้นของมอร์ฟีนอยู่ในช่วงที่จะหาปริมาณได้โดยประมาณ (47)

ความแม่นยำของวิธี EMIT ในการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะ ที่ใช้ในการวิจัยนี้มีความแม่นยำพอใช้ได้ คือมีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนภายในการทดลองเดียวกัน เท่ากับ 11.80 และ 10.24 เมื่อความเข้มข้นของมอร์ฟีนในปัสสาวะเท่ากับ 0.3 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Spiehler, V.R. และคณะ (1976) ศึกษาความแม่นยำของวิธี EMIT ในการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะ ได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เท่ากับ 12.7 เมื่อความเข้มข้นของมอร์ฟีนในปัสสาวะเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (45) และที่ Schneider, R.S. และคณะ (1973) ได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เท่ากับ 9.39 เมื่อความเข้มข้นของมอร์ฟีนในปัสสาวะ เท่ากับ 3.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (17)

ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะคนปกติ ระหว่างวิธี HPLC กรณีไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด และผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด และวิธี EMIT (ดังรายละเอียดในข้อ 4.4 หน้า 48) พบว่า เมื่อปัสสาวะมีมอร์ฟีนมาตรฐานความ

เข้มข้นสูงเกินกว่า 5.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิธี EMIT มีความจำกัดในการหาปริมาณได้โดยประมาณอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.3 - 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงรายงานผลเพียงว่า มีความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐานเกินกว่า 5.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่วิธี HPLC ทั้งกรณีไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด และผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรดสามารถหาปริมาณได้ แต่เมื่อปัสสาวะมีมอร์ฟีนมาตรฐานความเข้มข้นต่ำ (อยู่ในช่วง 0.3 - 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เช่น 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อตรวจโดยวิธี EMIT จะได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของมอร์ฟีนเท่ากับ 4.92 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สูงกว่าเมื่อตรวจโดยวิธี HPLC ทั้งกรณีไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด และผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของมอร์ฟีน เท่ากับ 4.23 และ 4.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากวิธี EMIT สามารถตรวจได้โดยตรงจากปัสสาวะ จึงไม่มีการสูญเสียมอร์ฟีนระหว่างขั้นตอนการแยกมอร์ฟีนจากปัสสาวะ เหมือนกับวิธี HPLC นอกจากนี้ ยังมีผู้รายงานว่าการไฮโดรไลสีสด้วยกรด ภายใต้ความดันทำให้มอร์ฟีนบางส่วนเกิดการสลายตัว (84) อีกทั้งขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นของการไฮโดรไลสีสด้วยกรด อาจเป็นสาเหตุทำให้มีการสูญเสียมอร์ฟีนมากกว่าเมื่อไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรดอีกด้วย

ในกรณีที่ตรวจมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วยซึ่งเสพติดเฮโรอีน การตรวจโดยวิธี EMIT จะไม่สามารถแยกความแตกต่างของมอร์ฟีน จากสารเมตาโบไลท์ตัวอื่นของเฮโรอีน เช่น มอร์ฟีนคอนจูเกต 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีน นอร์มอร์ฟีน เป็นต้น รวมทั้งเฮโรอีนที่ถูกขับถ่ายทางปัสสาวะโดยที่ยังไม่ถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายด้วย ทั้งนี้เป็นเพราะสารเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี้ชนิดต่อต้านต่อมอร์ฟีน ที่ใช้ในวิธี EMIT เช่นกัน แต่มีความไวสัมพัทธ์ต่าง ๆ กันเมื่อเทียบกับมอร์ฟีน (ตารางที่ 2 หน้า 18) ดังนั้นวิธี EMIT จึงตรวจและรายงานผลเป็นความเข้มข้นของโอพิเอทเทียบสมมูลย์กับมอร์ฟีน ส่วนวิธี HPLC จะสามารถแยกมอร์ฟีนจากสารเมตาโบไลท์อื่น ๆ ของเฮโรอีนได้ เนื่องจาก สารแต่ละตัวจะผ่านออกมาจากคอลัมน์ในเวลาต่างกัน แล้วแสดงด้วยพีคของสารแต่ละตัวแยกจากกัน ในกรณีที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสปัสสาวะด้วยกรด จะตรวจสารเมตาโบไลท์อิสระ ได้แก่ มอร์ฟีนอิสระเป็นส่วนใหญ่ ส่วนในกรณีที่ผ่านการไฮโดรไลสีสปัสสาวะด้วยกรด จะตรวจสารเมตาโบไลท์ทั้งหมดซึ่งได้แก่ มอร์ฟีนอิสระ และมอร์ฟีนคอนจูเกต เป็นส่วนใหญ่

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ ความเข้มข้นโอพิเอทสมมูลย์กับมอร์ฟีนในตัวอย่าง

ตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยซึ่งตรวจโดยวิธี EMIT กับความเข้มข้นของมอร์ฟีน ซึ่งตรวจโดยวิธี HPLC ที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด พบว่า ผลการวิเคราะห์ที่ตรวจโดยวิธี EMIT มีค่าสูงกว่า และสามารถตรวจพบโอพิเอทในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บในช่วงเวลาภายหลังจากได้รับเฮโรอีนครั้งสุดท้ายได้นานกว่าวิธี HPLC ทั้งนี้เนื่องจากวิธี EMIT ตรวจสารเมตา-โบไลท์ทั้งหมดของเฮโรอีนที่ถูกขับถ่ายออกมาในปัสสาวะ ในขณะที่วิธี HPLC ที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรดตรวจเฉพาะมอร์ฟีนอิสระ ซึ่งพบว่า ถูกขับถ่ายออกมาในปัสสาวะในช่วงเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเฮโรอีน (39) ในการวิจัยนี้ วิธี HPLC ที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรดตรวจพบมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยหลังจากได้รับเฮโรอีนครั้งสุดท้าย ได้ถึงประมาณ 8 ชั่วโมง 1 ราย ประมาณ 12 ชั่วโมง 1 ราย และประมาณ 48 ชั่วโมง 3 ราย ในขณะที่วิธี EMIT ยังตรวจพบได้ในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บในช่วงเวลาที่นานกว่านี้ คือสามารถตรวจพบได้ถึงประมาณ 48-120 ชั่วโมง ดังนั้นวิธี EMIT จึงมีข้อดีกว่าวิธี HPLC ซึ่งใช้สภาวะต่าง ๆ ดังที่ใช้ในการวิจัยนี้ ในการนำมาใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์เพื่อสำรวจผู้ติดสารเสพติดกลุ่มโอพิเอท อย่างไรก็ตามถ้ามีการพัฒนาสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้กับวิธี HPLC เช่น คอลัมน์ เครื่องตรวจรับ เป็นต้น อาจทำให้วิธี HPLC สามารถตรวจพบมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บในช่วงเวลาที่นานขึ้นกว่าเดิมได้

จากการวิจัยนี้พบว่า เฉพาะปัสสาวะที่เก็บครั้งแรกเท่านั้นที่เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี EMIT แล้ว ผลวิเคราะห์ที่ได้มีค่าต่ำกว่าวิธี HPLC ทั้งกรณีไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรดและผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรดเป็นอย่างมาก ในที่นี้จะอธิบายเฉพาะกรณีไม่ผ่านการไฮโดร-ไลสีสด้วยกรดก่อน เหตุผลที่ใช้อธิบายในเรื่องนี้ยังไม่พบว่ามีผู้ใดรายงานไว้ แต่เคยมีรายงานว่าในช่วงเวลาประมาณ 2 ชั่วโมงหลังจากได้รับเฮโรอีน จะมีการขับถ่ายเฮโรอีนออกมาในปัสสาวะด้วย พร้อมกับสารเมตาโบไลท์อื่น ๆ ของเฮโรอีน เช่น มอร์ฟีนอิสระ มอร์ฟีนคอนจูเกต 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนอิสระ 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนคอนจูเกต นอร์มอร์ฟีนอิสระ และนอร์มอร์ฟีนคอนจูเกต เป็นต้น (39) ซึ่งเฮโรอีนและ 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนอิสระ จะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นมอร์ฟีนได้ง่าย ระหว่างขั้นตอนการสกัดแยกมอร์ฟีนจากปัสสาวะ(23) ประกอบกับความไวสัมพัทธ์ของเฮโรอีน ในการเกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่อวิธี EMIT เทียบกับมอร์ฟีนแล้วน้อยกว่ามอร์ฟีน (20) จึงเป็นเรื่องที่น่าจะศึกษาต่อไปว่า การที่ผลวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะ ที่เก็บในช่วงเวลาหลังจากได้รับเฮโรอีนใหม่ ๆ เมื่อตรวจ

ด้วยวิธี HPLC ที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด มีค่าสูงกว่าเมื่อตรวจโดยวิธี EMIT เป็นอย่างมากนี้เป็นเพราะเหตุว่า ปริมาณมอร์ฟีนที่ตรวจได้โดยวิธี HPLC มิได้มีเฉพาะ มอร์ฟีน-อิสระ แต่มีมอร์ฟีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงมาจากเฮโรอีน และ 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนอิสระ ระหว่างขั้นตอนการสกัดแยกมอร์ฟีนจากปัสสาวะ ประกอบกับการที่ความไวสัมพัทธ์ของเฮโรอีนที่มีต่อวิธี EMIT น้อยด้วยนั้นเป็นจริงหรือไม่ หรือเป็นเพราะสาเหตุอื่น เช่นเดียวกันการที่ผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บครั้งแรกนี้เมื่อตรวจโดยวิธี HPLC ที่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด มีค่าสูงกว่าผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี EMIT เป็นอย่างมาก ก็ไม่พบว่ามีผู้ใดรายงานไว้ แต่มีรายงานว่าการไฮโดรไลสีสด้วยกรดนอกจากจะเปลี่ยน มอร์ฟีนคอนจูเกต เป็นมอร์ฟีนแล้ว ยังทำให้ เฮโรอีน 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนอิสระ และ 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนคอนจูเกต เปลี่ยนเป็นมอร์ฟีนด้วย (39) จึงเป็นเรื่องที่น่าจะได้มีการศึกษาต่อไปเช่นกันว่า การที่ผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บในช่วงเวลาหลังจากได้รับเฮโรอีนไม่นาน เมื่อตรวจโดยวิธี HPLC ที่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด มีค่าสูงกว่าเมื่อตรวจโดยวิธี EMIT เป็นอย่างมากนี้ เป็นเพราะสาเหตุดังกล่าวประกอบกับการที่ความไวสมพัทธ์ของเฮโรอีนที่มีต่อวิธี EMIT น้อยกว่ามอร์ฟีน เป็นจริงหรือไม่ หรือเป็นเพราะสาเหตุอื่น เนื่องจากผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บครั้งแรกนี้มีค่าแตกต่างกันมากระหว่างวิธี EMIT และวิธี HPLC ที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด และผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด จึงได้นำตัวอย่างปัสสาวะดังกล่าวไปขอความร่วมมือให้ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี RIA ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มโอพิเอทแอลคาลอยด์ในปัสสาวะเช่นกัน ปรากฏว่าผลการวิเคราะห์โดยวิธี RIA มีค่าใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ที่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด จึงกล่าวได้ว่า เฉพาะตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บในช่วงเวลาหลังจากได้รับเฮโรอีนไม่นาน (ประมาณ 2 ชั่วโมง) วิธี HPLC ที่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด จะให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกับวิธี RIA มากกว่าวิธี EMIT

การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ ความเข้มข้นของโอพิเอทเทียบสมมูลย์กับมอร์ฟีน ซึ่งตรวจโดยวิธี EMIT กับ ความเข้มข้นของมอร์ฟีน ซึ่งตรวจโดยวิธี HPLC ที่ผ่านการไฮโดร-ไลสีสด้วยกรด ได้แบ่งช่วงการเปรียบเทียบเป็น 3 ช่วง ช่วงแรกเป็นการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บครั้งแรก ดังที่กล่าวมาแล้ว ช่วงที่สอง คือช่วงที่ผลการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี EMIT รายงานผลว่า มีความเข้มข้นเกินกว่า 5.50

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นถึงความจำกัดในการหาปริมาณด้วยวิธี EMIT ได้สูงสุดไม่เกิน 5.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่วิธี HPLC ไม่มีขีดจำกัดสูงสุดในการตรวจปริมาณ ในช่วงที่สาม คือช่วงที่ผลการวิเคราะห์โดยวิธี EMIT มีค่าความเข้มข้นไม่เกิน 5.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจะแสดงผลการวิเคราะห์เป็นปริมาณโดยประมาณได้นั้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างผลการวิเคราะห์โดยวิธีทั้งสอง เท่ากับ 0.7639 ด้วยระดับนัยสำคัญ .05 เป็นที่ยอมรับกันในทางสถิติว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่อยู่ระหว่าง 0.7 - 0.9 จะถือว่า มีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรงสูง (85) และเมื่อนำผลการวิเคราะห์จากวิธีทั้งสองมาทดสอบการเปรียบเทียบข้อมูลเป็นคู่ พบว่า ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี EMIT จะมีค่าสูงกว่าวิธี HPLC ด้วยระดับนัยสำคัญ .05 เหตุผลข้อหนึ่งน่าจะเป็นเพราะเหตุที่ว่าวิธี EMIT สามารถตรวจได้โดยตรงจากปัสสาวะ จึงไม่มีการสูญเสียมอร์ฟีนในระหว่างขั้นตอนใด ๆ แต่วิธี HPLC ที่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด มีการสูญเสียมอร์ฟีนระหว่างขั้นตอนการไฮโดรไลสีสด้วยกรด และการสกัดแยกมอร์ฟีนจากปัสสาวะ แสดงให้เห็นว่า ในกรณีที่ตัวอย่างปัสสาวะมีความเข้มข้นของมอร์ฟีนต่ำ วิธี EMIT จะเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์มอร์ฟีนในปัสสาวะได้ดีกว่าวิธี HPLC ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ซึ่งใช้วิธีทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยโดเวกซ์ 50 ดับบลิว และการสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย

นอกจากนี้ จากการพิจารณาเปรียบเทียบข้อมูลความเหมาะสมด้านอื่น ๆ ในการตรวจมอร์ฟีนในปัสสาวะระหว่างวิธี HPLC และวิธี EMIT พบว่า

1. ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ วิธี EMIT จะใช้ปริมาณปัสสาวะเพียง 50 ไมโครลิตร ส่วนวิธี HPLC ต้องใช้ปริมาณปัสสาวะมากประมาณ 20-50 มิลลิลิตร
2. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ วิธี EMIT ตรวจได้โดยตรงจากปัสสาวะ ต้องการเทคนิคความชำนาญไม่มาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียงประมาณ 1 นาที ต่อหนึ่งตัวอย่าง ส่วนวิธี HPLC ต้องการขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์ ซึ่งยุ่งยาก เสียเวลาและต้องการเทคนิคความชำนาญสูง
3. ค่าใช้จ่าย วิธี EMIT ใช้เครื่องมือราคาสูง และน้ำยาสำเร็จรูปเฉพาะอย่าง ซึ่งมีราคาสูงมาก อีกทั้งน้ำยามีอายุการใช้งานที่จำกัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อละลายเป็นสารละลายแล้ว ส่วนวิธี HPLC

ใช้เครื่องมือราคาสูงเช่นกัน แต่สารเคมีที่ใช้ราคาปานกลาง และไม่จำกัดอายุการใช้งาน

4. สิ่งรบกวนการแปลผล ที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี EMIT ที่สำคัญได้แก่ ความขุ่นและพีเอชของปัสสาวะ ไลโซซัยม์ในปัสสาวะ (Endogenous lysozyme) และเกลือบางชนิด เช่น โซเดียม-คลอไรด์ แต่วิธี HPLC ขึ้นกับประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาตรวจ

5. ความจำเพาะเจาะจง วิธี EMIT ขาดความจำเพาะเจาะจง สามารถตรวจสารชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มโอพิเอทแอลคาลอยด์ได้ด้วยความไวสัมพัทธ์ต่าง ๆ กัน ทั้งยังมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสารบางตัวที่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกับมอร์ฟีนด้วย (20,41) ส่วนวิธี HPLC มีความจำเพาะเจาะจงสูง

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วยไทย (ซึ่งเสพติดเฮโรอีน) ตั้งแต่วันแรกที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล จนถึงเมื่อตรวจไม่พบสารดังกล่าวในปัสสาวะ ระหว่างวิธี HPLC และวิธี EMIT พิจารณาประกอบกับข้อมูลความเหมาะสมด้านอื่น ๆ ดังกล่าว อาจสรุปได้ว่า วิธี EMIT เป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองวิเคราะห์เพื่อสำรวจผู้ติดสารเสพติดกลุ่มโอพิเอท ซึ่งมีตัวอย่างจำนวนมาก ๆ และต้องการผลเร็ว (Mass Screening) ใช้ทางด้านคลีนิค เพื่อวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะผู้ป่วยในการติดตามผลการรักษาการงดเสพ และการรักษาผู้ที่ใช้ยาเสพติดกลุ่มโอพิเอทเกินขนาดในภาวะฉุกเฉิน อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่ได้ผลบวกโดยวิธี EMIT เมื่อผลการวิเคราะห์มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการยุติธรรม สิทธิอันชอบธรรมของบุคคล จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่น ๆ ที่ไม่ใช่วิธีการทางอิมมูโนด้วย เพื่อยืนยันผลที่ตรวจได้ด้วยวิธี EMIT และเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าเป็นสารตัวใดในกลุ่มโอพิเอท ซึ่งวิธีการทางอิมมูโนไม่สามารถแยกชนิดได้ วิธีการที่สามารถนำมาใช้ได้คือวิธีการทางโครมาโตกราฟฟี่ ได้แก่ ไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (High Performance Liquid Chromatography) แก๊สโครมาโตกราฟฟี่ (Gas Chromatography) และโครมาโตกราฟฟี่ชนิดผิวบาง (Thin layer Chromatography)