หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่สำคัญขั้นหนึ่งในการวิเคราะห์แอมเฟตามินในปัสสาวะ คือ การสกัดแอมเฟตามินออกจากสารแทรกแซงต่าง ๆ ในปัสสาวะ วิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เคมี เป็นวิธีที่มีผู้ใช้กันมานาน และยังนิยมใช้อยู่เพราะไม่ต้องการผู้ชำนาญงานมาก วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้หาได้ง่ายในห้องปฏิบัติการทั่วไป แม้ว่าวิธีนี้จะต้องใช้เวลามากขึ้นในการศึกษาตัวอย่างกลุ่มใหญ่ (Kaistha และ Jaffe 1971)

การสกัดแอมเฟตามินออกจากเนื้อเยื่อหรือของเหลวจากร่างกายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เคมีนั้น ถ้าสกัดจากระบบที่มีความเป็นด่างที่ pH มากกว่า 10 การสกัดจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุด กล่าวคือจะได้แอมเฟตามินออกมามากที่สุดและมียาชนิดอื่น ๆ ปนมาน้อยที่สุด (Kaistha และ Jaffe 1971) นอกจากนี้มีผู้รายงานว่า การละลายของแอมเฟตามินระหว่างชั้นปัสสาวะและชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ และค่าสัมประสิทธิ์ของการละลาย (partition coefficient) จะสูงที่สุดเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เคมีที่มี polarity ต่ำ เช่น เบนซีน อีเทอร์ เป็นต้น (Bastos และ Hoffman 1974) Bost, Sutheimer และ Sunshine (1976) ได้เสนอการสกัดแอมเฟตามินจากปัสสาวะ โดยใช้คลอโรฟอร์มซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์เคมีที่มี polarity ต่ำกว่าอีเทอร์ แต่คลอโรฟอร์มมีความถ่วงจำเพาะสูงกว่าน้ำ ทำให้ไม่สะดวกในการแยกชั้นคลอโรฟอร์มออกจากชั้นของปัสสาวะ ด้วยเหตุผลดังกล่าว ผู้ทำวิทยานิพนธ์นี้จึงได้เลือกใช้การสกัดแอมเฟตามินออกจากปัสสาวะด้วยอีเทอร์ โดยการปรับปัสสาวะให้เป็นด่าง pH 10-11 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

การวิเคราะห์แอมเฟตามินที่สกัดออกจากปัสสาวะแล้วทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี สเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี เป็นต้น การวิเคราะห์โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี อาจตรวจหาแอมเฟตามินในรูปเบสอิสระ (Bastos และ Hoffman 1974) หรือในรูปอนุพันธ์กรดต่าง ๆ เช่น อนุพันธ์ของกรดซัลฟูริค (Kaistha, Tadrus และ Janda 1975) การตรวจหาแอมเฟตามินในรูปเบสอิสระ มีข้อเสียเพราะแอมเฟตามินเบสสลายตัวง่าย และให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำ การวิเคราะห์โดยวิธีหลังจึงเป็นที่นิยมมากกว่า โดยปกติการตรวจแอมเฟตามินด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี ต้องการสารเคมี เช่น สารละลาย นินไฮดรินที่จะมาทำปฏิกิริยากับแอมเฟตามินเบส หรืออนุพันธ์กรดของแอมเฟตามิน เพื่อทำให้เกิดสีมองเห็นได้ แต่ Monforte, Bath และ Sunshine (1972) ได้เสนอการวิเคราะห์อีกวิธีหนึ่ง คือ

การตรวจหาแอมเฟตามินโดยเตรียมแอมเฟตามินเบสให้เป็นอนุพันธ์เรืองแสงแทนการทำให้เกิดสี เป็นการเพิ่มความสะดวกในการวิเคราะห์และเพิ่มความไวของวิธีให้สูงถึงระดับนาโนกรัม ผู้รายงานคณะนี้รายงานว่าสามารถวิเคราะห์อนุพันธ์ NBD ของแอมเฟตามินได้ถึงระดับ 200 นาโนกรัม

การเตรียมแอมเฟตามิน ให้เป็นอนุพันธ์เรืองแสงมีได้หลายวิธี เช่น เตรียมเป็นอนุพันธ์ของ dansyl chloride (DANS-Cl) (Seiler และ Demisch 1978) หรือเตรียมเป็นอนุพันธ์ของ 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2,1,3-Oxadiazole (NBD-Cl) (Bost,Sutheimer และ Sunshine 1976 ; Monforte, Bath และ Sunshine 1972) เป็นต้น Ghosh และ Whitehouse (1968) ได้กล่าวถึงข้อได้เปรียบในการเลือกใช้ NBD-Cl ว่า NBD-Cl สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อม เช่น ความชื้นได้ดีกว่า DANS-Cl มาก นอกจากนี้ NBD-Cl ยังเป็นสารที่ไม่เรืองแสงจนกว่าจะรวมตัวเป็นอนุพันธ์กับกลุ่มอะมิโนชนิดปฐมภูมิ หรือทุติยภูมิ จึงจะให้ปรากฏการณ์เรืองแสงทำให้ NBD-Cl ที่เหลือจากปฏิกิริยาเตรียมอนุพันธ์ไม่รบกวนการตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์เรืองแสงบนแผ่นซิลิกาเจล (Seiler และ Demisch 1978) ข้อได้เปรียบอีกประการหนึ่งของอนุพันธ์ NBD-Cl เมื่อเทียบกับอนุพันธ์เรืองแสงอื่น คือ สามารถดูดแสงในช่วงแสงสีขาว (Seiler และ Demisch 1978) ทำให้ไม่ต้องใช้เซลชนิดพิเศษในการวัด แต่การใช้อนุพันธ์ NBD-Cl มีข้อเสีย คือ excitation และ emission band ซ้อนกัน (Monforte, Bath และ Sunshine 1972 ; Seiler และ Demisch 1978)

การตรวจวิเคราะห์ในวิทยานิพนธ์นี้ ใช้ปฏิกิริยาในสารละลายที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน คือใช้แอมเฟตามินที่ละลายในอีเทอร์ ทำปฏิกิริยากับ NBD-Cl ที่ละลายอยู่ในคลอโรฟอร์ม วิธีนี้เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Monforte, Bath และ Sunshine (1972) แต่การเกิดอนุพันธ์ของอะมินชนิดต่าง ๆ กับ NBD-Cl นั้นเกิดได้ทั้งในชั้นของน้ำและชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์เคมี (Seiler และ Demisch 1978) Hoof และ Heyndrickx (1974) เสนอการเตรียมอนุพันธ์ NBD-Cl ของแอมเฟตามิน ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมไบคาร์บอเนทและ เมทิลไอโซบิวทิลคีโตน แต่วิธีที่ใช้ในรายงานนี้เป็นวิธีที่มีความสะดวกมากกว่าวิธีของ Hoof และคณะ ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งหาได้ง่ายในห้องปฏิบัติการณ์ทั่วไป และให้ความไวของวิธีวิเคราะห์สูงเป็นที่น่าพอใจ คือ 1 ไมโครกรัมของแอมเฟตามินเบส หรือเท่ากับ 200 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และจากการใช้ เอทิลอาซิเตท : ไซโคลเฮกเซน 2:3 โดยปริมาตร (Hoof และ Heyndrickx 1974) ทำให้แยกอนุพันธ์แอมเฟตามินออกจากอนุพันธ์ของอะมินชนิดต่าง ๆ ได้โดยใช้เวลาในการทำโครมาโตกราฟฟีเพียงเล็กน้อย แต่ข้อพึงสังเกตุคือผลการศึกษาที่พบว่า phenylpropanolamine HCl ที่นำมาทดลองทำปฏิกิริยากับ NBD-Cl แล้วได้อนุพันธ์มากกว่า 1 ชนิด และมีอนุพันธ์ชนิดหนึ่งที่ให้ค่า R_f ใกล้เคียงกับอนุพันธ์แอมเฟตามินมาก ทำให้ไม่สามารถแยกอนุพันธ์แอมเฟตามินออกจากอนุพันธ์ phenylpropanolamine ได้ และยา

แก้ไข้หวัดบางชนิด เช่น ดีคอลเจน มี phenylpropanolamine HCl ในปริมาณถึง 12.5 มิลลิกรัมต่อเม็ด การขับถ่ายสารนี้อาจสูงถึงร้อยละ 90 ทางปัสสาวะ (Clarke 1978) ดังนั้น การวิเคราะห์แอมเฟตามินจากปัสสาวะของคนที่รับประทานยาแก้ไข้หวัดที่ประกอบด้วย phenylpropanolamine HCl จึงอาจทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้

จากการศึกษา excitation และ emission spectrum ของอนุพันธ์ NBD-Cl ของแอมเฟตามินให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Monforte, Bath และ Sunshine (1972) คือค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์มากที่สุดเมื่อ excitation และ emission wavelength เท่ากับ 468 และ 520 นาโนเมตรตามลำดับ แต่เนื่องจาก excitation และ emission spectrum มีส่วนซ้อนกันอยู่ จึงได้ใช้ความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่ได้จากผลต่างของความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่ 520 นาโนเมตร กับความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่เกิดจากสิ่งรบกวนพื้นฐาน ที่ 480 นาโนเมตร

การศึกษาอิทธิพลของการตกตะกอนโปรตีนในปัสสาวะ ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Monforte Bath และ Sunshine (1972) นี้ ทำให้ค่าความเข้มข้นของอนุพันธ์ที่เทียบจากกราฟมาตราฐานลดลงอย่างเห็นได้ชัด สาเหตุอาจจะเนื่องมาจากโปรตีนต่าง ๆ ที่มีในปัสสาวะของคนทั่วไป เช่น อาลบูมิน (Dammed 1965) กล่าวคือ NBD-Cl อาจเกิดอนุพันธ์เรืองแสงกับกลุ่มอะมิโนชนิดปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ หรือ กลุ่มไทออล ของปลายเส้นเปปไทด์ ของโปรตีน ซึ่งจะทำให้เกิดการรบกวนต่อการเรืองแสงของอนุพันธ์แอมเฟตามิน โดยวิธีวิเคราะห์สเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรีได้ (Seiler และ Demisch 1978)

แม้ว่าจะได้กำจัดสารแทรกแซงการเรืองแสงโดยการตกตะกอนโปรตีนแล้ว แต่สารละลายอนุพันธ์ของปัสสาวะยังให้ความเข้มข้นของแอมเฟตามินประมาณ 0.005 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งเป็นค่าที่สูงเมื่อเทียบกับผลการทดลองของ Monforte, Bath และ Sunshine (1972) ที่รัดความเรืองแสงสัมพัทธ์ของอนุพันธ์แอมเฟตามินจากปัสสาวะคนปกติได้ค่าความเข้มข้นเพียง 0.0005 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร สาเหตุอาจจะเนื่องจากการทดลองนี้ใช้ปริมาณปัสสาวะสูงกว่าวิธีของ Monforte ทั้งนี้อาจเนื่องจาก กรดอะมิโนหรือสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ซึ่งมีในปัสสาวะของคนปกติ เช่น ไกลซีน กลูทามิน ยูเรีย และ ครีเอทีนิน เป็นต้น (Dammed 1965) เพราะสารประกอบเหล่านี้ไม่ถูกกำจัดด้วยวิธีการตกตะกอนโดยใช้คอปเปอร์ซัลเฟต และอาจเกิดอนุพันธ์เรืองแสงกับ NBD-Cl ได้ (Ghos และ Whitehouse 1968)

แม้ว่าความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ในการวิเคราะห์แอมเฟตามินเข้มข้น 0.001 ถึง 0.005 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยผ่านการตกตะกอนโปรตีน น้อยกว่าการวิเคราะห์โดยไม่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน แต่ความแม่นยำในการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์แอมเฟตามินเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ดังนั้นการวิเคราะห์แอมเฟตามีนที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ การวิเคราะห์โดยตกตะกอนโปรตีนน่าจะเหมาะสมกว่าเพราะ ให้ความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ดี และยังลดความเข้มข้นของอนุพันธ์แอมเฟตามีนที่พบในปัสสาวะคนปกติอีกด้วย อย่างไรก็ดีความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ไม่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนจะสูงกว่าความถูกต้อง เมื่อวิเคราะห์โดยตกตะกอนโปรตีน ซึ่งอาจจะเนื่องจากการที่มีสารละลายคอปเปอร์เหลืออยู่ในสารละลายมาก ซึ่งอนุภาคของโลหะเหล่านี้ อาจรวมตัวกับอนุพันธ์เรืองแสง หรือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอีเล็คตรอนของอนุพันธ์เรืองแสง (Guilbault 1967) แสดงว่าการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี วิธีที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน แม้จะทำให้ค่าความเข้มข้นของอนุพันธ์ที่สกัดจากปัสสาวะคนปกติที่เทียบจากกราฟมาตราฐานลดลงบ้าง แต่ก็มีข้อเสียในด้านค่าความถูกต้องที่ผิดจากความจริงมาก

การวิเคราะห์ด้วยวิธี ราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยใช้สารสำเร็จรูปนี้แม้ว่าจะไม่มีความยุ่งยากในการเตรียมแอนติบอดี และสารติดฉลาก แต่ก็มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง ดังนั้น ผู้รายงานจึงได้พยายามตัดทอนปริมาณแอนติบอดีและสารติดฉลากลงจากที่บริษัทแนะนำไว้ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ลงให้มากที่สุด

การหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสมในรายงานนี้ ใช้หลักทั่วไป คือหาร้อยละของการรวมตัวโดยให้แอนติบอดีปริมาณต่าง ๆ กัน อินคิวเบทกับสารติดฉลากปริมาณคงที่ ที่อุณหภูมิและเวลาคงที่ ปริมาณแอนติบอดีที่นิยมใช้กันมาก คือปริมาณที่รวมตัวกับสารติดฉลากได้ร้อยละ 50 (Abraham 1974) ปริมาณนี้จะเป็นปริมาณที่ให้ความไวของวิธีวิเคราะห์สูงสุด (Skelley, Brown และ Besch 1973) แต่การวิเคราะห์สารต่าง ๆ โดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ นอกจากปริมาณแอนติเจนและสารติดฉลากแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบท เป็นต้น (Ekins 1974) ดังนั้น การเลือกใช้ปริมาณแอนติบอดีอาจจะแตกต่างไปจากหลักที่กล่าวข้างต้นแล้วบ้างทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของสภาวะอื่น ๆ ด้วย ผลจากการศึกษาหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม อิทธิพลของปริมาณแอนติบอดีต่อกราฟมาตราฐาน จึงได้เลือกใช้แอนติบอดี ที่มีความเจือจางขั้นสุดท้ายเป็น 25/200 หรือ 1/8 ซึ่งต่างจากความเจือจางที่บริษัทแนะนำไว้ คือ 200/500 หรือ 1/2.5 หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ สามารถลดปริมาณแอนติบอดีได้เป็น 1/8 ของปริมาณที่บริษัทแนะนำ

โดยปกติการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารติดฉลากจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความแตกต่างของกราฟมาตราฐานของ ราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ แต่ผู้รายงานไม่พบความแตกต่างของกราฟมาตราฐานแอมเฟตามีนเมื่อใช้ ปริมาณสารติดฉลากฉลดลงครึ่งหนึ่ง ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากค่าความเบี่ยงเบนมาตราฐานที่ค่อนข้างสูง จึงทำให้ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าปฏิกิริยา

การรวมตัวของแอนติบอดีเปลี่ยนแปลงเมื่อใช้สารติดฉลากปริมาณต่างกัน ดังนั้นเพื่อประหยัดเวลานับรังสี ผู้รายงานจึงได้เลือกใช้ปริมาณสารติดฉลากที่มีความเจือจางขั้นสุดท้ายเท่ากับ 50/200 หรือ 1/4 จากความเจือจางขั้นสุดท้ายที่บริษัทแนะนำไว้เป็น 200/500 หรือ 1/2.5 หรืออีกนัยหนึ่งคือ สามารถลดปริมาณสารติดฉลากลงได้เป็น 1/4 ของปริมาณที่บริษัทแนะนำไว้ ซึ่งจะทำให้เพิ่มปริมาณตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ได้จาก 100 ตัวอย่างเป็น 400 ตัวอย่าง ต่อน้ำยาสำเร็จรูป 1 ชุด หรือในกรณีที่จำเป็น ก็สามารถใช้สารติดฉลากเพียง 1/8 ของปริมาณที่บริษัทแนะนำ เพื่อเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการวิเคราะห์เป็น 800 ตัวอย่าง ได้ เพราะได้ลดปริมาณแอนติบอดีเป็น 1/8 ของปริมาณที่บริษัทแนะนำอยู่แล้ว

ผลจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอนติบอดี และสารติดฉลากผิดไปจากที่บริษัทแนะนำไว้นี้ จะทำให้ค่าสมดุลย์ของปฏิกิริยา (K) เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งจะทำให้ระดับความเชื่อถือได้ของการวิเคราะห์ต่างกันออกไปด้วย

การศึกษาด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ มีขั้นตอนที่สำคัญขั้นหนึ่ง คือ แยกสารติดฉลากรูปอิสระออกจากรูปที่จับอยู่กับแอนติบอดี เพราะประสิทธิภาพของการแยกจะมีผลต่อความไวและความแม่นยำของการวิเคราะห์ ประสิทธิภาพในการแยกโดยวิธีแยกส่วนตกตะกอนที่ใช้ในรายงานนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ความเข้มข้นของโปรตีนในระบบ และอุณหภูมิที่ใช้ (Ratcliffe 1974) ผู้รายงานจึงได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการแยกส่วนตกตะกอน และพบว่าการแยกที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส โดยทิ้งให้ตกตะกอนนาน 10 นาที เป็นอย่างน้อยจะให้ประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่าที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เวลาเท่ากัน

แม้ว่าวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตนี้จะให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนเป็นที่น่าพอใจใช้เวลาน้อย ใช้สารเคมีและเครื่องมือทั่ว ๆ ไป ในห้องปฏิบัติการ แต่การตกตะกอนวิธีนี้มีข้อเสียคือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวนี้จะตกตะกอนโปรตีนอื่น ๆ นอกจากอิมมิวโนกลอบูลิน ซึ่งอาจรบกวนผลการวิเคราะห์ได้ (Skelley, Brown และ Besch 1973) ผู้รายงานจึงได้ศึกษาอิทธิพลของปัสสาวะคนปกติต่อกราฟมาตราฐานและพบว่า ปัสสาวะคนปกติ 25 และ 50 ไมโครลิตรไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะของกราฟมาตราฐานอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นข้อชี้แนะว่า สารต่าง ๆ ในปัสสาวะของคนปกติเช่นโปรตีน และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะคนปกติ 25 ถึง 50 ไมโครลิตรไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาอิมมิวโนแอสเสย์ และการตกตะกอนด้วยวิธีนี้

ผลจากการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมของการอินคิวเบทในปฏิกิริยาอิมมิวโนแอสเสย์ แสดงว่า เมื่อใช้เวลาอินคิวเบท 2 ชั่วโมงมีค่าการรวมตัวมากกว่า เมื่ออินคิวเบทนาน 1 ชั่วโมง

อย่างเห็นได้ชัด และค่าการรวมตัวนี้จะคงที่ไปจนถึง 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาชี้แนะว่าปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดีกับแอนติเจนว่าเกิดขึ้นสมบูรณ์ในเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง และปฏิกิริยาจะคงที่ไปจนถึง 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาอินคิวเบทนาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง เพื่อสะดวกในการอินคิวเบทค้างคืนที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส

การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ในรายงานนี้ได้คำนวณความไวของวิธีการวิเคราะห์ตามวิธีของ Abraham (1974) คือการหาค่าความเบี่ยงเบนมาตราฐานที่จุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารละลายมาตราฐาน ที่ระดับความเชื่อถือได้ 95% ความเข้มข้นที่จุดนี้จะเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน การคำนวณความไว โดยวิธีนี้ จึงขึ้นอยู่กับความแม่นยำของการวัด ความไวของวิธีวิเคราะห์ที่พบในการศึกษานี้ มีค่า 1 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง หรือ 22 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

จากผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมเฟตามินมาตราฐาน ที่ใช้จาก 15.6 ถึง 1000 เป็น 156.3 ถึง 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่าให้ค่าความแม่นยำและความถูกต้องของการวิเคราะห์ดีขึ้น

ดังนั้นการเลือกใช้ช่วงความเข้มข้นมาตราฐานจึงขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการวิเคราะห์ว่าต้องการความไว ความถูกต้อง และความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ระดับใด ผู้รายงานได้เลือกใช้แอมเฟตามินความเข้มข้นสูงเนื่องจากให้ความแม่นยำของการวัดที่ดีกว่า และการใช้สารมาตราฐานความเข้มข้นสูงนี้ทำให้ไม่ต้องเจือจางปัสสาวะตัวอย่างก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ ซึ่งจะช่วยลดความผิดพลาดของการวิเคราะห์ลงได้ (Challand, Goldie และ London 1974) อย่างไรก็ดีแม้ว่า จากการเพิ่มแอมเฟตามินมาตราฐานให้สูงขึ้นจะทำให้ความแม่นยำของการวัดดีขึ้นบ้างก็ตาม ความแม่นยำของการวิเคราะห์ก็ยังน้อยอยู่ เมื่อเทียบกับการวิเคราะห์อื่น ๆ Mulé, Whitlock และ Jukofshy (1975) ก็เสนอรายงานทำนองเดียวกันนี้ว่า เมื่อวิเคราะห์แอมเฟตามินด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์แล้วความแปรปรวนของการวัดจะสูงกว่าการวิเคราะห์ มอร์ฟีน และบาบิทูเรท

เมื่อนำวิธีที่ดัดแปลงแล้วนี้มาศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีตามวิธีของ Abraham และคณะ (1970) พบว่าวิธีนี้ให้ความจำเพาะเป็นที่พอใจ คือ ให้ค่าปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดเป็นร้อยละ 1.06 กับเมทแอมเฟตามิน และร้อยละ 0.61 กับ เฟนิลโปรบานอลามิน แม้ว่ายา 2 ชนิดนี้มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับแอมเฟตามินมาก

เมื่อนำปัสสาวะตัวอย่างจากอาสาสมัคร 5 ราย มาศึกษาโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ พบว่าลักษณะการขับถ่ายสารนี้ออกมาในปัสสาวะในอาสาสมัครทั้ง 5 ราย แตกต่างกันทั้งในด้านเวลาและปริมาณสูงสุดที่แอมเฟตามินถูกขับออกมา เช่นใน 15 ชั่วโมง หลังรับประทานยา มี

แอมเฟตามินที่ถูกขับถ่ายออกมาจากอาสาสมัคร 5 ราย นี้ตั้งแต่ 5.7 ถึง 20.7 ของปริมาณที่รับประทาน ผลการวิจัยนี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Beckett, Rowland และ Turner (1965) ที่พบว่า 16 ชั่วโมง หลังจากอาสาสมัคร 6 คน ที่รับประทานแอมเฟตามินซัลเฟต 10-15 มิลลิกรัมแล้ว โดยที่ไม่ได้ควบคุมกรดด่างของปัสสาวะ มีปริมาณแอมเฟตามินที่ถูกขับออกทางปัสสาวะตั้งแต่ร้อยละ 4.9 ถึง 28.9 ของปริมาณที่รับประทาน ส่วนอาสาสมัครรายที่ 3 ซึ่งมีลักษณะการขับถ่ายแอมเฟตามินแตกต่างจากรายอื่น ๆ มาก อาจจะเนื่องมาจากความแปรปรวนของร่างกายของอาสาสมัครเอง เช่นมีการดูดซึมและการขับถ่ายยาที่แตกต่างออกไปหรืออาจเป็นไปได้ว่าอาสาสมัครรายนี้มีการขับถ่ายที่ผิดปกติ

จากการควบคุมคุณภาพของวิธีวิเคราะห์ตามวิธีของ Challand,Goldie และ London (1974) คือ วัดปริมาณแอมเฟตามินตัวอย่างควบคุม (control sample) ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ ทำให้ทราบความแม่นยำระหว่างการวิเคราะห์แต่ละครั้ง และความคงที่ของกราฟมาตราฐานได้ทุกช่วง พบว่าคุณภาพของการวิเคราะห์ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ คือ ปริมาณแอมเฟตามินที่วัดได้ในทุกความเข้มข้นที่ทำการควบคุมจะต่างกันไม่เกิน 2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตราฐานของการศึกษา

การวิเคราะห์แอมเฟตามินทั้ง 3 วิธีที่เสนอนี้ ผู้รายงานได้พยายามดัดแปลงและปรับปรุงเพื่อให้สะดวกในการวิเคราะห์และลดค่าใช้จ่ายให้เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มใหญ่ และได้ใช้วิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี สำหรับวิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรีนี้ แม้ว่าให้ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่พอใช้ได้ก็ตามแต่ความเข้มข้นของอนุพันธ์ที่สกัดได้จากปัสสาวะคนปกติ ที่สูงมาก เมื่อวิเคราะห์โดยไม่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน และเมื่อวิเคราะห์โดยผ่านการตกตะกอนโปรตีนแล้วค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จะผิดไปจากความเป็นจริง ดังนั้นผู้รายงานจึงขอเสนอแนะการปรับปรุงวิธีนี้ในโอกาสต่อไปหรือแก่ผู้ที่สนใจอื่น ๆ คือการแยกอนุพันธ์ NBD-Cl ของแอมเฟตามินด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี สเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี วิธีนี้จะกำจัดสารแทรกแซงต่าง ๆ โดยไม่ต้องผ่านการตกตะกอนโปรตีน แล้วจึงสกัดอนุพันธ์ออกจากแผ่นซิลิกาเจล ด้วยเมทานอล นำสารละลายเมทานอลมาระเหยให้แห้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังควรระวังสารแทรกแซงที่อาจติดมากับเครื่องแก้วที่ใช้ ซึ่งผู้รายงานได้ใช้วิธีทำความสะอาดเครื่องแก้วตามวิธีของ Terhaar และ Porro (1977) โดยการล้างคราบไขมันออกด้วยน้ำร้อนหลังจากล้างด้วยสารละลายที่ไม่มีผงซักฟอกเจือปนและล้างด้วยน้ำจนสะอาดแล้วจึงแช่เครื่องแก้วค้างคืนในกรดไนตริกเข้มข้นร้อยละ 50

ข้อมูลที่เสนอในรายงานนี้ นอกจากจะเป็นประโยชน์ในการให้ความรู้เกี่ยวกับการศึกษาลักษณะของปัญหาเสพติดแอมเฟตามีนและการหาแนวทางแก้ไขแล้ว ยังอาจเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น การบำบัดรักษา และติดตามผลการรักษาคนไข้เสพติด การรักษาอาการเฉียบพลันที่เกิดจากการใช้ยามากเกินขนาด เป็นต้น และเป็นความรู้พื้นฐานสำหรับผู้ที่สนใจจะศึกษาวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีอื่น ๆ และใช้ประยุกต์ สำหรับการศึกษาด้านการวิเคราะห์ยาชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย