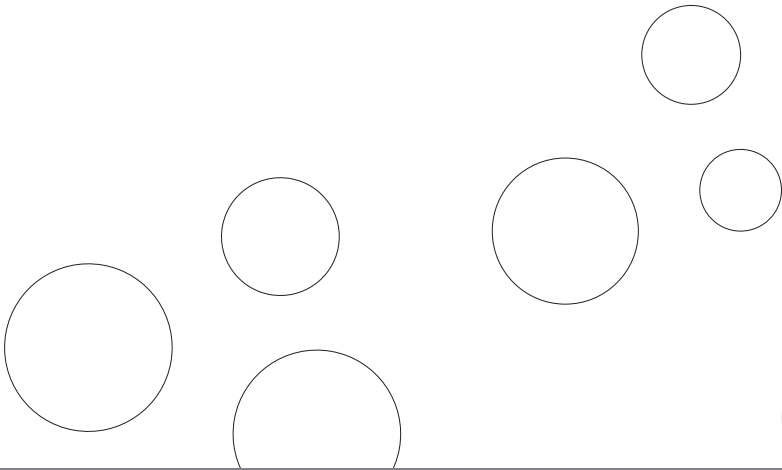


Kemi



Kemien bag FIA-metoden



Kemi



Baggrund: Om FIA-metoden og undersøgelse af koffein



I det følgende er der en præsentation af FIA-metoden, koffein samt hvordan metoden kan bruges til at analysere koffein i en prøve. Denne tekst findes også i selve spillets teoridel. Enkelte ting vedrørende opsætningen, og som ikke har betydning for indholdet, kan variere lidt.

Afsnittet dækker følgende temaer:

Koffein

- Koffeins kemiske opbygning og fysiske egenskaber
- Koffeins fysiologiske påvirkninger
 - Koffein binder til adenosinreceptor
 - Nedbrydning af koffein i kroppen
 - Doser for effekt/overdosis

FIA

- Fordele ved FIA
- FIA – opbygning og funktion
- FIA – bestemmelse af koffeinindhold

Spektrofotometri

Standardkurver

Dele af materialet tager udgangspunkt i en undersøgelse af koffein, som er baseret på Yuji Yamauchi et al.: "Quasi-flow injection analysis for rapid determination of caffeine in tea using the sample pre-treatment method with a cartridge column filled with polyvinylpyrrolidone", Journal of Chromatography A, 1177 (2008) 190–194.

Koffein

Koffein er et opkvikkende stof. Det virker ved at stimulere centralnervesystemet (CNS), så cellerne lettere affyrer signaler. Molekylet er det mest anvendte CNS stimulerende stof. Stoffet er kendt og anvendt for dets opfriskende effekt mod træthed.

Koffein hører til stofgruppen alkaloider. Alkaloider findes bl.a. naturligt i flere plantearter, som f.eks. kaffe, te og kakao. Der er fundet koffein i over 60 plantearter. Alkaloider består ofte af komplicerede ringstrukturer, der både indeholder carbon, hydrogen og nitrogen.

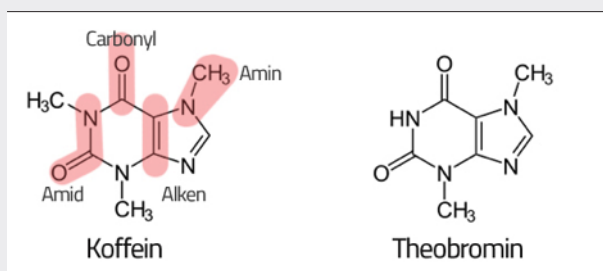
Koffein optages i blodet fra tarmen. Koffein er både fedt- og vandopløseligt. Det medfører, at det kan trænge ind i hjernen via blod-hjerne-barrieren. Koffein om-dannes især i leveren. Det sker ved, at enzymer fjerner methylgrupper fra molekylet. Herved dannes bl.a. theobromin, som giver en anden fysiologisk effekt. Det er bl.a. afslapning af glat muskulatur og en virkning på hjertet, der minder om koffeins virkning. Koffein udskilles hovedsageligt via urinen. Stoffet har en halveringstid på 3-6 timer.

Koffein kan give mange effekter. Det kan være både angst, årvågenhed, udholdenhed og abstinenser. Alle effekter afhænger af den dosis, man har indtaget.

Koffeins kemiske opbygning og fysiske egenskaber

Den kemiske formel for koffein er $C_8H_{10}N_4O_2$.

Koffeinmolekylet hører til stofgruppen alkaloider. Det produceres i planter som kaffe og te ud fra adenosin, der indgår i DNA og RNA. I biosyntesen af koffein producerer planterne også en vis mængde theobromin. Theobromin findes derfor også i f.eks. kaffe og te og i udtræk af planterne. Theobromin og koffein minder meget om hinanden både fysisk og kemisk. Derfor kan det være vanskeligt at adskille dem i analyser. I FIA-metoden vil det kræve, at man vælger en moderat flowhastighed i systemet. Ellers bliver stofferne ikke adskilt. Koffein har en kraftigere stimulerende effekt på CNS end theobromin.



Figur: Koffeins og theobromins kemiske opbygning. Koffein hedder 1,3,7-trimethyl-xanthin, eller 1,3,7-trimethyl-purin-2,6-dion. Theobromin hedder 3,7-dimethyl-xanthin, eller 3,7-dimethyl-purin-2,6-dion.

Figuren viser, at koffein er opbygget af 2 ringsystemer. Disse ringsystemer navngives puriner, som igen er opbygget af en pyrimidin (6-leddet ring) og en imidazol ring (5-leddet ring). Puriner er heterocykliske aromatiske forbindelser. Koffein er opbygget af 2 carbonylgrupper og 4 tertiære aminer. Både koffein og theobromin indeholder også en amid gruppe. Det er en funktionel gruppe, der består af en carbonylgruppe, der er bundet til et C-atom og et N-atom. Desuden indeholder de et alken, som er en umættet kulbrinte, der indeholder en carbon-carbon-dobbeltbinding. Den eneste forskel på koffein og theobromin er en ekstra methylgruppe, der sidder i position 1 på koffein. De funktionelle grupper i koffein er alken, amid og amin.

Fysiske egenskaber som opløselighed og kogepunkt

Koffein er et hvidt krystallinsk stof. Det har et smeltepunkt på 235-238°C, og dets molarmasse er 194,19 g/mol. Opløseligheden i 20°C vand er 2,6 g/100 ml og 66 g/100 ml kogende vand. Theobromin er et lignende krystallinsk stof, som kan forekomme gulligt. Theobromin har et smeltepunkt på 345-350°C og en molarmasse på 180,19 g/mol. Opløseligheden i 20°C vand er 33mg/100 ml.

Kilder:

- Aktuel Naturvidenskab | 3 | 2007
- Ugeskrift for Læger 166/22, 2004
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Caffeine> - set d. 12. januar 2016
- Hermansen, Kjeld m.fl. - <http://www.vidensraad.dk/content/kaffe-sundhed> - set d. 12. januar 2016
- https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/c0750pis.pdf - set d. 12. januar 2016

- <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=T4500&interface=Product%20No.&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&lang=en®ion=DK&focus=productN=0%20220003048%20219853286%20219853103> - set d. 12. januar 2016

Koffeins fysiologiske påvirkninger

Koffein påvirker fysisk udholdenhed

Koffein har været på listen over dopingmidler, hvor man max. må have 12 mikrogram/ml urin. Det blev dog fjernet fra WADA's (World Anti-Doping Agency) liste, da der ikke var sikre studier, som kunne dokumentere den præstationsfremmende effekt af koffein.

Koffein øger musklernes sammentrækningsevne. Dette blev før i tiden koblet sammen med, at koffein øger mængden af adrenalin i blodet, dvs. kroppens eget stresshormon. Men denne teori er så godt som forkastet som den eneste årsag. Nyere viden har nemlig vist, at koffein skaber signaler inde i cellen, som frigiver intracellulær calcium i muskelceller, og det skaber igen mulighed for en muskelsammentrækning. Problemet med denne teori er dog, at det kun er påvist ved toksiske (giftige) doser af koffein. Men ved lavere doser end dér, hvor det bliver giftigt, ses der ikke nogen frigivelse af intracellulær calcium, og dermed burde der ikke være nogen fremmende effekt.

Koffein binder til adenosinreceptor

Koffein indeholder strukturelt 2 ringsystemer, som også kaldes puriner. Det ene ringsystem er purinen adenosin. Derfor kan koffein binde til receptorer, der normalt binder adenosin, dvs. adenosinreceptorerne. Der findes flere former for adenosinreceptorer, og man har endnu ikke fuldt ud forstået funktionen for de forskellige receptorer.

Aktiveringen af adenosinreceptorerne er kendt for at aktivere omdannelsen af ATP til cAMP. cAMP er et intracellulært signalmolekyle, der bl.a. aktiverer cAMP-kinasen. Denne kinase åbner en K⁺-kanal i membranen, og det medfører, at K⁺ siver ud af cellen. Derved bliver cellen hyperpolariseret, så nerveaktiviteten hæmmes. Adenosin hører altså til et system, der hæmmer nerve-signaler.



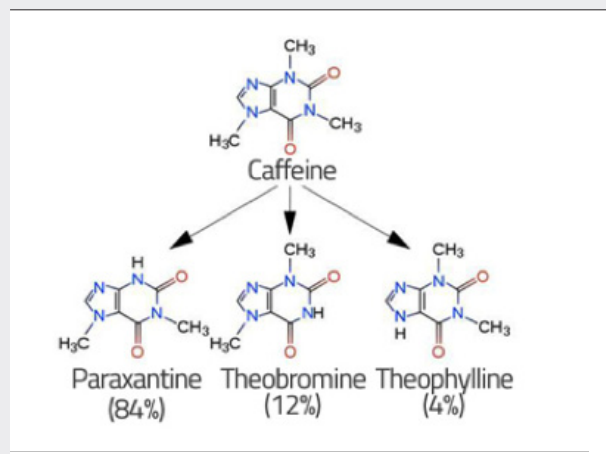
Koffein har en antagonistisk binding til adenosinreceptoren. Stoffet hæmmer altså signaler fra adenosin og dermed omdannelsen af ATP til cAMP. Derfor modvirker koffein også cAMP's hæmning af nervesignaler i hjernen. Koffein skaber derfor en øget aktivitet, der bl.a. frigiver dopamin og serotonin. Disse to neurotransmittere hænger sammen med flere af de effekter, man har set af koffein. Det gælder bl.a. udholdenhed, mindre træthed, afslappethed og virkning mod demens.

Kilder:

- Ugeskrift for Læger 166/22, 2004
- Hermansen, Kjeld m.fl. - <http://www.vidensraad.dk/content/kaffe-sundhed> - set d. 12. januar 2016

Nedbrydning af koffein i kroppen

Når koffein nedbrydes i leveren, bliver det til 3 nye stoffer. Disse stoffer har hver deres betydning for den effekt, man oplever, når man f.eks. drikker kaffe og cola:



Theobromin – dette stof er med til at øge mængden af både ilt og næringsstoffer til hjernen.

Paraxanthin – dette stof kan øge fedtforbrændingen til muskelaktivitet, og det sætter kroppen i stand til at yde mere.

Theophyllin – dette stof kan øge pulsen og koncentrationsevnen.

Man ved, at mennesket ret hurtigt udvikler tolerance overfor koffein, hvilket typisk er tegn på afhængighed.

Man kan altså blive immun overfor koffein og kan derfor efter længere tids indtag have brug for mere koffein end tidligere for at opnå en fysiologisk virkning.

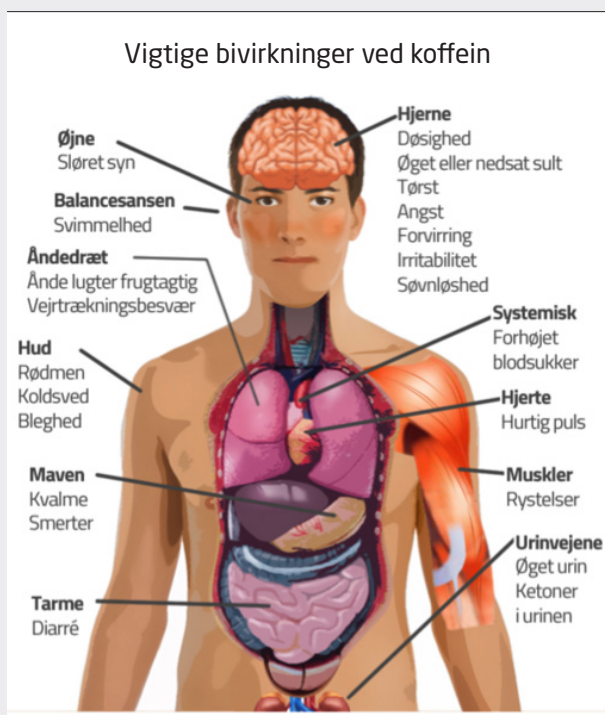
Der er både fordele og ulemper ved at få koffein i kroppen. I høje doser kan man opleve rystelser og generelt ubehag. American Chemical Society anbefaler derfor også, at man ikke indtager mere end ca. 400 mg koffein om dagen. Det svarer til 3 store kopper kaffe, 5 dåser Red Bull eller 8 kopper sort te. Hvis man f.eks. indtager 400 mg koffein 3 gange om dagen i 7 dage, så melder folk om søvnforstyrrelser på grund af deres indtag af koffein.

Kilder:

- <http://videnskab.dk/krop-sundhed/derfor-kvikker-kaffe-dig-op-om-morgen> - set d. 12. januar 2016
- Energidrikke i Danmark Undersøgelse af indtaget blandt 10-35-årige, DTU Fødevareinstituttet, Afdeling for Ernæring, november 2014

Doser for effekt/overdosis

Kaffeforbruget og dermed koffein er stort i Danmark. Faktisk ligger vi på en 4. plads over kaffeforbruget i hele verden, målt pr. indbygger. Hele top 5 er besat af skandinaviske lande. Danskerne forbruger 8,7 kg kaffe pr. pers. pr. år. Dertil kommer koffein fra te og især koffeinholdige energidrikke, der også udgør en væsentlig del. Mænd drikker mere kaffe end kvinder. Mænd drikker mellem 3 og 4 kopper om dagen, hvor kvinder ligger på omkring 3 kopper om dagen.



Der er ikke registreret nogen dødsfald på grund af kaffeindtag. Men eksperimentelt har man undersøgt LD50 til at være på 150-200 mg/kg hos rotter. Til gengæld er der også undersøgelser, der peger på flere gode egenskaber ved kaffeindtag, som i flere af tilfældene er koblet til koffein. Undersøgelserne tyder bl.a. på, at koffein mindsker risikoen for at udvikle forskellige kræftformer, demenssygdomme og type 2-diabetes.

Kilder:

- Hermansen, Kjeld m.fl. - <http://www.vidensraad.dk/content/kaffe-sundhed> - set d. 12. januar 2016
- Ugeskrift for Læger 166/22, 2004
- Dansk kemi 6/7, 2013

FIA

FIA er en forkortelse for Flow Injection Analysis. Navnet beskriver meget godt opbygningen af systemet. Ved injektion af prøver i et flow af en bære-væske (et opløsningsmiddel) kan apparatet herefter lave en analyse af indholdet i prøven.

Fordele ved FIA

Fordelen ved denne metode ligger i det konstante flow. Det giver nemlig mulighed for:

- Mange prøver på kort tid uden at stoppe målingerne.
- Stor nøjagtighed.
- Miljørigtig metode, da det kun kræver små mængder af reagenser.
- Økonomisk billig analyse pga. relativt små mængder reagenser og simpelt apparatur.

Metoden er desuden blevet endnu mere effektiv og billig, efter at det er blevet muligt at opsamle data digitalt med en computer tilsluttet til systemet.



Hurtigheden af disse analyser går fra 10-30 sekunder pr. prøve. Metoden er meget anvendt i laboratorier, der analyserer vandprøver, jordprøver, miljøanalyser, farmakologiske analyser og mange flere.

Kilde:

- <http://www.flowinjectiontutorial.com/index.html> - set d. 12. januar 2016



FIA – opbygning og funktion

Om FIA-systemet

FIA-systemet findes i forskellige varianter, alt efter hvad man ønsker at undersøge.

Overordnet består FIA-systemet af en fysisk og en kemisk del.

Den fysiske del (se figuren) sørger for en række konstante forhold, så den eneste variable er koncentrationen af det stof, man ønsker at undersøge i en prøve. De konstante forhold er:

- Prøvernes volumen er den samme.
- Bære-væsken ("carrier") holder den samme flow-hastighed, og derfor bevæger alle prøverne sig igennem slangesystemet med samme hastighed.
- Det slangesystem, som bære-væsken bevæger sig igennem, har en konstant opbygning, så alle prøver behandles identisk.
- Bærestrømmen flytter prøven med sig, og derfor kan man injicere en ny prøve, uden at den bliver blandet sammen med den foregående.
- Prøven udtages/detekteres det samme sted, og derfor er der i alle prøverne sket den samme opblanding mellem bære-strøm og prøve.
- Man behøver ikke at vente på ligevægt i en reaktion mellem prøve og et reagens.

Når man injicerer en prøve i bære-væsken, vil den gradvist blive opblandet mere og mere med bære-væsken – lidt ligesom, hvis man hælder et farvestof i en å. Denne opblanding sker på samme måde fra prøve til prøve, når prøvens volumen, bære-væskens hastighed og slangesystemet er konstant. Man kalder også prøvens opblanding for prøvens dispersion. Opblandingen sker altid på samme måde - og derfor kan man beregne, hvor meget af prøven, der er blandet op med bære-strømmen til et hvilket som helst bestemt tidspunkt/sted langs slangesystemet. Ud fra det kan man regne sig tilbage til den koncentration, som prøven må have.

I nogle tilfælde kan man nøjes med at udnytte de fysiske forhold i FIA-metoden. Det gælder, hvis det uden videre kan lade sig gøre at detektere de stoffer, man vil undersøge. I andre tilfælde er man nødt til at tilføje et kemisk

lag i metoden. Her tilsætter man et reagens til bærestrømmen. Reagenset tjener det formål, at det reagerer med prøven, så de stoffer, man vil undersøge, bliver målbare. Det kan f.eks. være, at de får en farve, der kan registreres i en detektor.

I dette spil er det kun FIA's fysiske fordele, der udnyttes. Koffein indeholder nemlig aromatiske strukturer, som absorberer UV-lys. Derfor kan koffein – uden tilsætning af reagens – detekteres i et spektrofotometer.

I denne version af FIA udnytter man desuden, at man kan adskille koffein og theobromin fra hinanden. De 2 stoffer har nemlig forskellig molekylvægt. Så undervejs i FIA-systemets kolonne separeres de 2 stoffer, så de ankommer til detektoren (spektrofotometret) på forskellige tidspunkter. Derfor kan man måle indholdet af koffein separat fra theobromin.

Tidligere analyserede man prøvers koncentrationer af bestemte stoffer ved at udsætte dem for reagenser i en kolbe. Her måtte man vente på, at der var opstået kemisk ligevægt, før man kunne måle og beregne en prøves koncentration af et bestemt stof. Men med FIA kan man måle en prøves koncentration meget tidligt i reaktionen, fordi det, der sker i bærestrømmen, følger et mønster, som kan beregnes. Metodemæssigt sparer det megen tid.

FIA-systemets komponenter

Systemet er baseret på en peristaltisk pumpe, der sørger for at pumpe en bære-væske (et opløsningsmiddel) gennem systemet i et kontinuert flow. De prøver, man vil undersøge, sprøjtes ind i bærevæsken. Man kan sende flere prøver af sted lige efter hinanden, uden at de bliver blandet sammen.

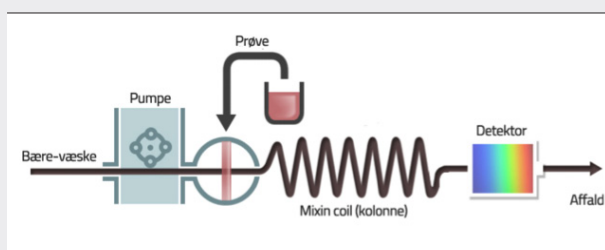
Systemet består af:

- Automatisk pipette (autosampler) til at tage mange prøver hurtigt.
- Pumpe, der sørger for et konstant flow af en bærevæske (et opløsningsmiddel).
- Indføring af prøver i bærevæsken.
- Mixing coil, en kolonne (en tynd slange), hvor prø-



verne og bære-væsken gradvist blandes mere og mere sammen.

- En detektor, der kan registrere indholdet af bestemte kemiske stoffer.
- Eventuelt tilsætning af et reagens, der reagerer med prøven, så det bliver muligt at registrere indholdsstofferne i detektoren.
- En affaldsbeholder, der opsamler prøverne og opløsningsmidlet.



Figuren viser flow injektionssystemets opbygning. Detektoren kan f.eks. være et spektrofotometer, hvis de kemiske stoffer har en farve.

- Automatisk pipettering (autosampler): Bruges i mange typer af analyse-apparater. I FIA har automatikken stor betydning. Det betyder nemlig, at systemet kan håndtere mange prøver hurtigt efter hinanden. Det er nemt at foretage prøver, da det er enkelt at indføre prøverne direkte i bære-væsken. De meget tynde slanger gør desuden, at apparaturet kan analysere meget små mængder - og dermed skabes der også kun små mængder affald.
- Den peristaltiske pumpe: Sørger for at pumpe en bære-væske gennem systemets tynde slanger i et konstant flow. Man kan sende flere prøver afsted lige efter hinanden, uden at de indbyrdes bliver blandet sammen. Metoden skaber meget nøjagtige resultater. Apparatet kan ret nemt ændres. Det er vigtigt, da flow hastigheden bestemmer, om stoffer i prøverne enten bliver adskilt fra hinanden, eller om de når at reagere med et eventuelt reagens, inden de når frem til detektoren. Man kan altså skrue op og ned for flowhastigheden.
- Mixing coil: Tynd slange, hvor prøverne gradvist blandes mere og mere med bære-væsken, når bære-væsken pumpes igennem slangen. Ved kanterne i slangen bremses bære-væsken lidt, mens der er mere fart på væsken i midten af slangen. Det er denne forskel i hastighed, der gør, at bære-væske og prøve bliver blandet. Når man kender flowet, flowsystemets dimensioner og prøvens volumen, kan man beregne graden af opblanding til et bestemt tidspunkt. Diameteren og længden kan justeres på kolonnen (mixing coil/slangen). Længden, diameteren og pumpens flow er nemlig med til at styre, om stofferne skal nå at adskilles, eller om der skal nå at forløbe nogle reaktioner i flowet.
- Detektoren: Skal kunne håndtere meget små mængder. Det løses i de fleste detektorer ved, at målingerne sker i et meget lille rum (flowcelle) for enden af mixing coil. Hvis detektoren er et spektrofotometer, måles det lys, der ikke absorberes, og ud fra viden om den samlede mængde lys beregnes det absorberede lys. Alt efter hvilke stoffer, der skal måles på, anvendes forskellige detektorer. Hvis man skal måle på et stof, der har en farve og dermed kan absorbere lys, anvender man f.eks. et spektrofotometer. Et spektrofotometer består af et spektrometer og en lyskilde. Nogle gange har stofferne ikke i sig selv en farve, der kan detekteres i spektrofotometeret. Så kan man tilsætte et reagens, der danner en farvet kemisk forbindelse sammen med det pågældende stof. Man kan også anvende ionselektive elektroder til detektion. Det kan f.eks. være en nitratelektrode, hvis man skal måle vandprøvers indhold af nitrat. Det kan også være en fluoridelektrode, hvis man skal måle flourid i tandpasta.
- Spektrometer og spektrofotometer: Et spektrofotometer er et instrument, der kan bestemme intensiteten af det lys, som udsendes fra en lampe i spektrofotometret (I_0), og af det lys, der har passeret gennem en given opløsning (I). Som oftest udvælger man en bestemt bølgelængde. Forskellen mellem de 2 lysintensiteter er således et mål for, hvor meget lys opløsningen har absorberet. Det kan vises, at denne såkaldte absorbans er givet ved logaritmen til forholdet mellem de 2 lysintensiteter ($\log I_0/I$), og den er direkte relateret til koncentrationen af det absorberende stof. Dvs. ved at måle de 2 lysintensiteter kan man simpelt beregne koncentrationen.



Kilde:

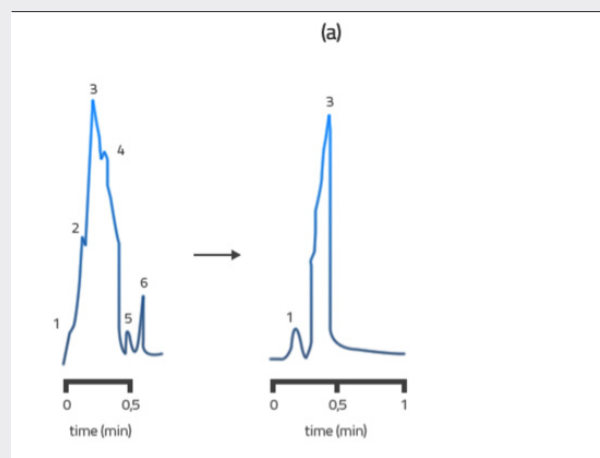
- <http://www.flowinjectiontutorial.com/index.html> - set d. 12. januar 2016

FIA bestemmelse af koffeinindhold

FIA kan bruges til at bestemme indholdet af koffein i forskellige former for drikkevarer. Her er der dog en udfordring. For sammen med koffein findes der mange andre indholdsstoffer i f.eks. kaffe. Og det kan forstyrre resultatet.

Koffein kan detekteres ved hjælp af spektrofotometri, fordi koffein-molekyler indeholder aromatiske strukturer. Og aromatiske strukturer absorberer UV-lys. Men mange andre forbindelser i kaffe og te indeholder også aromatiske strukturer. Blandt disse er der f.eks. polyfenolerne. De skal fjernes først, for at man er sikker på, at det er koffein, man detekterer og ikke polyfenolerne. Man kan fjerne polyfenolerne ved at forbehandle prøverne med stoffet PVP (polyvinylpyrrolidone). Det er et polymer-materiale, der binder polyfenoler, men ikke koffein.

Efter forbehandlingen har vi nu en kaffeopløsning, der ikke indeholder polyfenoler. Der er dog stadig theobromin i opløsningen, som kemisk og fysisk ligner koffein meget. Den eneste forskel på de to molekyler er en ekstra methylgruppe, der sidder på koffein, men ikke på theobromin. Dette gør theobromin meget mindre opløseligt i vand end koffein. Derfor kan de 2 stoffer adskilles i FIA-systemets mixing coil ved at bruge den rette bære-væske (opløsningsmiddel) - men altså kun efter, at polyfenolerne er fjernet med PVP.



Figur gengivet efter: Yuji Yamauchi et al.: "Quasi-flow injection analysis for rapid determination of caffeine in tea using the sample pre-treatment method with a cartridge column filled with polyvinylpyrrolidone", *Journal of Chromatography A*, 1177 (2008) 190–194.

Den første del af figuren, som er angivet med (a), viser en analyse, der er forbehandlet med PVP, som fjerner alle polyfenolerne fra prøverne, inden de køres i FIA (2,4,5 og 6). Dernæst er FIA i stand til at adskille theobromin (1) og koffein (3). Det er arealet under de 2 toppe, der er et udtryk for koncentrationen af de 2 stoffer. På x-aksen angives tiden for, hvornår prøverne registreres. Denne tid kaldes retentionstiden, og den er et udtryk for, hvor lang tid en kemisk forbindelse i prøven er om at komme igennem systemet. Der vil være forskellige retentionstider for koffein og theobromin, hvilket giver to toppe.

Den bagerste af de 2 grafer, som er angivet med (b), er en analyse, der ikke er forbehandlet med PVP. Derfor er der flere toppe. Det er toppene for polyfenoler, og 1 og 3 er ikke adskilt.

Figuren viser altså, hvor vigtigt det er at forbehandle prøverne med PVP.

Spektrofotometri

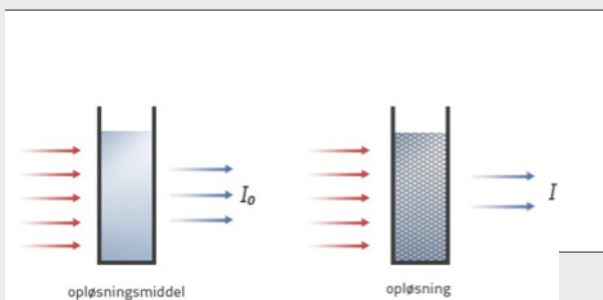
Spektrofotometri går ud på at sende lys gennem en opløsning, der kan absorbere bestemte bølglængder af lyset. Den lysmængde, der absorberes, følger Lambert-Beers lov. Loven siger, at absorbansen A er lig produktet mellem længden af væsken, ekstinktionskoeff-



ficienten og koncentrationen af stoffet, der absorberer lyset ved den aktuelle bølglængde.

$$A = l \cdot \epsilon \lambda \cdot [\text{stof A}]$$

Ekstinktionskoefficienten fortæller, hvor effektivt lyset svækkes ved f.eks. absorption. Ekstinktionskoefficienten afhænger af stoffet, der absorberer lyset, og af den specifikke bølglængde lys, som prøven udsættes for. Længden af væsken i måleenheden i et spektrofotometer (kuvetten) er oftest 1 cm, men sådan er det ikke i FIA, da analysen foregår i tynde rør. Det kan altså ses, at absorbansen er lineær sammenhængende med koncentrationen af stoffet, der absorberer lyset. Jo mere stof der er, desto mere lys absorberes.

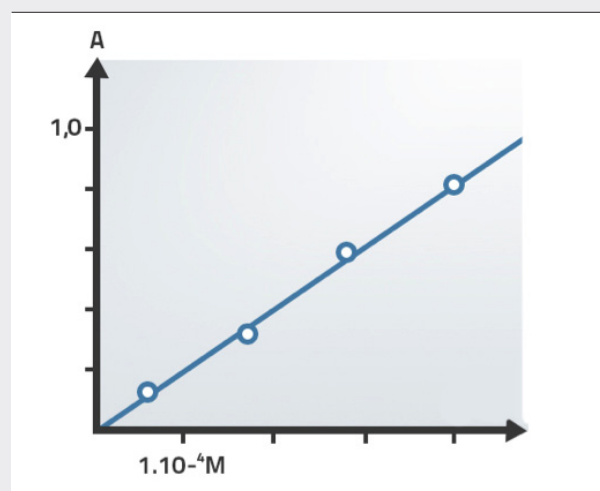


Hvis man kender ekstinktionskoefficienten for stoffet ved den anvendte bølglængde, kan man bestemme koncentrationen direkte ud fra den målte absorbans. Hvis man ikke kender denne, skal der laves en standardkurve for kendte koncentrationer.

Læs mere om spektrofotometri her: <https://www.labster.com/wiki/spectrophotometry-da/>

Standardkurve

Man laver en standardkurve ved at lave en række absorbansmålinger på kendte koncentrationer af det stof, der skal analyseres. Nu kan denne standardkurve bruges til at bestemme koncentrationer i ukendte prøver efterfølgende.



Ved hjælp af den målte absorbans kan koncentrationen nu aflæses på standardkurven.

I FIA-systemet kommer der ikke kun én koncentration og dermed én absorbans måling. Igennem FIA-systemet vil koffeinmolekylerne bevæge sig gennem mixing coil i samlet flok. Men der vil være få, der er hurtigere og få, der er langsommere end den store klump. Derfor er det nødvendigt at finde arealet under toppene, som svarer til mange absorbansmålinger på kort tid. Når man finder dette areal, vil det altså svare til den samlede absorbans og dermed den samlede mængde koffein i prøven.

Kilde:

- Journal of Chromatography A, 1177 (2008) 190–194