
"Photothermische Ablenkungsspektroskopie -
Potential eines neuen Messverfahrens für biopharmazeutische Fragenstellungen"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Bernhard Gotter

geboren am 27.09.1979 in Nordhausen

Gutachter

1. Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. Karsten Mäder
3. Prof. Dr. Dr. Jürgen Lademann

Datum der Verteidigung: 12.04.2012

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

a_i	$1/\mu$ ($i = p(\text{Probe}), g(\text{Gasschicht}), u(\text{Unterlage})$)
b	Konstante für verschiedene Zusammenhänge [Bedeutung jeweils im Text].
A_i	Amplitude des Signals der photothermischen Ablenkung [$i = A(\text{Anfangssignal}); E(\text{Endpunkt}); \max(\text{Maximum})$]
c	Konzentration [% m/m]
c_{wi}	Spezifische Wärme [$\text{J g}^{-1} \text{K}^{-1}$] ($i = p(\text{Probe}), g(\text{Gasschicht}), u(\text{Unterlage})$)
d_L	Durchmesser Laserspot
D	Diffusionskoeffizient [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]
E_i	Elektromagnetisches Feld ($i = r(\text{Reflexion}); t(\text{Abschwächung})$)
f	Frequenz [Hz]
f_w	Brennweite [mm]
h_i	Energie (Erklärungen der Indizes im Text)
I	Intensität der Strahlung [W cm^{-2}]
I_0	Intensität der Strahlungsquelle [W cm^{-2}]
I_d	Strahlungsstromdichte [$\text{W cm}^{-2} \text{Hz}^{-1}$]
j	$\sqrt{-1}$
k	Konstante für verschiedene Zusammenhänge [Bedeutung jeweils im Text].
l_β	optische Absorptionslänge [cm]
l	Weglänge (genauere Definition im Text)
L	Dicke einer Probe
m	Anstieg
M_t	Gesamte diffundierte Masse
n	Anzahl
n_i	Brechungsindex ($i = p(\text{Probe}); g(\text{Gasphase})$)
N	komplexer Brechungsindex
q_i	Wärmeflux [Wm^{-2}] ($i = cd(\text{conduction})$)
Q	Wärmeenergie
$R(\lambda)$	Reflexion [%]
S_i	Singulettzustand ($i = 1; 2$)
t_i	Zeit [s; min; h] ($i = s(\text{Schwingungsdauer})$)
$t_{1/2}$	Zeit bei Erreichen der halbmaximalen Konzentration
$T(\lambda)$	Transmission [%]
T_i	Triplettzustand ($i = 1; 2$)
T_d	Wärmedurchgangskoeffizient
T_i	Temperatur ($i = g(\text{Gasphase}); s(\text{Oberfläche}); w(\text{Wärmequelle}); m(\text{Mittelwert})$)
U	Spannung
V	Volumen
y_t	Transversaler Versatz des Detektionslasers
y_{zc}	Zero Crossing Distanz
z_f	Länge des Fokus
z_n	normaler oder senkrechter Versatz des Detektionslasers (PDS)
z_p	Position des Laserfokus in der Probe (konfokale Raman Mikroskopie)
z_u	tatsächliche Messtiefe (konfokale Raman Mikroskopie)

α_i	Thermische Diffusivität oder Temperaturleitfähigkeit [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$] ($i = \text{p(Probe), g(Gasschicht), u(Unterlage)}$)
β	optischer Absorptionskoeffizient [cm^{-1}]
γ	Korrekturfaktor zur Bestimmung von α ($\gamma = 1$ für transparente Proben; $\gamma = 1,44$ für opake Proben)
Δ	eingestellte Messtiefe (konfokale Raman Mikroskopie)
ε	Winkel der Phasenverschiebung
η	Faktor für die Abschwächung der Temperaturamplitude
θ_i	Winkel der photothermischen Ablenkung ($i = \text{n normale Ausrichtung; i = t transversale Ausrichtung}$)
κ_i	Thermische Leitfähigkeit oder Wärmeleitfähigkeit [$\text{J cm}^{-1} \text{s}^{-1} \text{K}^{-1}$] ($i = \text{p(Probe), g(Gasschicht), u(Unterlage)}$)
λ	Wellenlänge [nm]
λ_{th}	thermische Wellenlänge [nm]
μ_i	Thermische Diffusionslänge [cm] ($i = \text{p(Probe), g(Gasschicht), u(Unterlage)}$)
σ	Wellenzahl (thermische Welle)
ρ_i	Dichte [g cm^{-3}] ($i = \text{p(Probe), g(Gasschicht), u(Unterlage)}$)
τ	Licht in Wärme Umwandlungskoeffizient
φ_d	Winkel der Strahldivergenz
Φ	Phase des Signals der photothermischen Ablenkung [$^\circ$]
ν_i	Energieniveau einer Molekülschwingung ($i = 1, 2, 3$)
ν_t	Raumvektor parallel zur Probenoberfläche
ω	Frequenz der Winkelmodulation
rF	Relative Luftfeuchtigkeit
Re	Realteil eines Signals
AL	Anregungslaser
AUC	Area under the curve
DTL	Detektionslaser
PSD	Positionempfindlicher Detektor (Position Sensitive Device)
NA	Numerische Apertur

Inhalt

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis.....	ii
1. Einführung	1
1.1. Einleitung und Motivation	1
1.2. Zielstellung	3
2. Allgemeiner Teil	3
2.1. Der photothermische Effekt.....	3
2.1.1. Photothermische Ablenkung an Feststoffen	3
2.1.2. Thermische Wellen.....	8
2.1.2.1. Grundlagen des Wärmetransports und Wärmeleitung.....	8
2.1.2.2. Erzeugung und Ausbreitung thermischer Wellen in einem stationären Temperaturfeld	11
2.1.2.3. Optische Erzeugung thermischer Wellen – der photothermische Effekt.....	13
2.1.3. Das elektronische photothermische Signal	19
2.1.4. Zusammenfassung PDS	20
2.2. Grundlagen der Raman Mikroskopie.....	21
2.3. Stofftransport – Bestimmung des Diffusionskoeffizienten	24
3. Experimenteller Teil	26
3.1. Experimenteller Aufbau der verwendeten Photothermischen Messsysteme	26
3.1.1. Aufbau des photothermischen Messplatzes Monobloc Einheit	26
3.1.2. Entwicklung eines photothermischen Scannersystems.....	31
3.1.2.1. Aufbau des Double Beam Laser Scanning Systems	31
3.1.2.2. Aufbau des Laser Scanning System.....	32
3.1.3. Steuerung und Datenverarbeitung	34
3.1.4. Software	35
3.1.5. Messoptionen.....	37
3.2. Membranen	39
3.2.1. Herstellung der DDC Membranen.....	39

3.2.2.	Präparation von Rinderhufmembranen	40
3.3.	Auswahl und Herstellung der Formulierungen.....	42
3.4.	Substanzen	42
3.5.	Geräte.....	43
3.6.	Bestimmung der thermischen Diffusivität von Rinderhuf.....	43
3.6.1.	Bestimmung der thermischen Diffusivität anhand der Zero Crossing Distanz	45
3.6.2.	Bestimmung der thermischen Diffusivität unter Verwendung der Amplituden Methode	47
3.6.3.	Laser Flash Methode zur Bestimmung der thermischen Diffusivität.....	47
3.7.	Bestimmung der Wirkstoffkonzentration halbfester Formulierungen.....	48
3.7.1.	Konzentrationsuntersuchungen mittels PDS	48
3.7.2.	Konzentrationsuntersuchungen mittels FTIR-ATR und -PAS	50
3.7.3.	Konzentrationsuntersuchungen mittels FT Raman Spektroskopie.....	50
3.8.	Vorgehensweise zur Untersuchung der Wirkstoffpenetration und –diffusion in Membranen mittels PDS und Raman Mikroskopie	50
3.8.1.	Experimentelle Konfigurationen der Membranmessungen	51
3.8.2.	Bestimmung des lateralen Diffusionskoeffizienten.....	54
3.8.3.	Tiefenmessung.....	55
4.	Resultate und Diskussion.....	57
4.1.	Vergleich der PDS mit anderen optischen Messverfahren anhand der Bestimmung des Wirkstoffgehalts halbfester Zubereitungen	57
4.2.	Anwendung der PD Bildgebung zur Untersuchung des Stofftransports in Membranen	63
4.2.1.	Betrachtung der lateralen Diffusion von Dithranol in einer DDC Membran	63
4.2.2.	Untersuchung der Freisetzung von Curcumin	71
4.3.	Bestimmung des Diffusionskoeffizienten in DDC Membranen.....	79
4.4.	Thermische Diffusivität von Rinderhuf.....	88
4.5.	Tiefenmessungen zur Penetration an Keratinmembranen	92

5.	Fazit und Perspektiven.....	98
6.	Literatur	101
7.	Anhang.....	109
7.1.	Dokumentation zum Scannersystem für die Thermische Linse Oberflächenprüfung ..	109
7.2.	Lebenslauf und Publikationen	122
7.3.	Erklärung	124
7.4.	Danksagung	125

1. Einführung

1.1. Einleitung und Motivation

Mit einer Vielzahl von Funktionen ausgestattet, ist die Haut nicht nur das größte, sondern auch eines der komplexesten Organe des Menschen. Primär bewahrt sie den Organismus vor dem Eindringen von Toxinen oder Mikroorganismen und dem unkontrollierten Wasserverlust. Auch gegenüber der in hoher Dosis lebensfeindlichen UV-Strahlung bilden die äußeren Hautschichten eine effektive Barriere. Eine mögliche Auskühlung oder Überhitzung des Körpers wird durch ihre thermoregulativen Eigenschaften inhibiert.

Unter dermatologischen Aspekten gilt es nun, um Erkrankungen der Haut zu begegnen und bestenfalls eine Heilung zu erzielen, Arzneistoffe in oder durch die Haut an ihren Wirkort zu transportieren. Die effektive Überwindung dieses hoch entwickelten Barriersystems bedarf jedoch entsprechender Strategien. Inzwischen stehen hierzu zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung. Durch intensive Forschung im Bereich der physikochemischen Charakterisierung halbfester Grundlagen werden die Zusammenhänge zwischen Vehikel und Arzneistoff besser verstanden, so dass den zu applizierenden Wirkstoffen die für deren Bioverfügbarkeit optimalen Formulierungen zugeordnet werden können [1]. Die Aufklärung von Aufbau und Funktion der Haut bis auf die molekulare Ebene ist weit fortgeschritten, wodurch sich neue Möglichkeiten ergeben, die Barriereeigenschaften zu beeinflussen [2]. Ebenso kann die Zusammensetzung von Salben, Cremes, Gelen und Pasten in Hinblick auf die Bioverfügbarkeit der enthaltenen Arzneistoffe optimiert werden. Zur Beschleunigung der Wirkstoffpenetration in die tieferen Hautschichten können auch Penetrationsbeschleuniger, so genannte Enhancer, zur Anwendung kommen. Weitere Optionen sind Mikroemulsionen, liposomenhaltige Formulierungen oder physikalische Mittel wie die Anwendung von Ultraschall, um die Permeabilität der Haut zu erhöhen [3, 4].

Die Überprüfung der erarbeiteten Strategien und Konzepte zur Penetrationssteigerung der Arzneistoffe auf ihre tatsächliche Funktionalität und Wirksamkeit muss im nächsten Schritt erfolgen. Hierzu bedient man sich physikochemischer Größen, wie dem Diffusionskoeffizienten, dem Verteilungs- und Permeationskoeffizienten als Vergleichsparameter. Die Erlangung dieser Kenngrößen kann generell mittels *in-vivo*- und *in-vitro*-Analysen erfolgen, wobei erstere als Untersuchungen am lebenden Organismus letztendlich aufgrund ihrer stärkeren Aussagekraft angestrebt werden. Bis jedoch in die klinische Prüfphase übergegangen werden kann, wird in der Grundlagenforschung zunächst auf *in-vitro* Untersuchungen zurückgegriffen. In Versuchsreihen werden biologische Membranen wie z.B. humane oder tierische Haut oder deren Adnexa wie Nagel und Huf in Penetrations- oder Permeationsexperimenten untersucht, um darauf folgend Rückschlüsse auf das Verhalten der untersuchten Substanzen bei der Applikation *in vivo* zu erhalten. An die eigentliche Versuchsdurchführung schließen sich meist mehrere Schritte an, die die Probenaufarbeitung und die Analyse mit geeigneten Verfahren umfassen. Analysenverfahren auf Basis von Probenextraktion und chromatographischen Methoden haben sich hierfür als sehr gut geeignet erwiesen. Durch die chromatographischen Trennverfahren werden die komplexen Proben in ihre Bestandteile zerlegt, so dass die Analyten separiert, frei von störenden Substanzen quantifiziert werden können. Diese Art der Analytik bietet zwei große Vorteile, nämlich, dass sie ein sehr breites Spektrum an Substanzen zu erfassen vermag, und dass generell sehr gute Nachweisgrenzen erreicht werden können.

Doch ist diese Vorgehensweise nicht für die *in-situ* Untersuchung der Penetration von Wirkstoffen in die Haut geeignet, da sie auf dem Prinzip des Probenziehens basiert. Jedoch ist gerade die „on-line“ Verfolgung der Wirkstoffdiffusion vor Ort, d. h. in der Haut oder den Modellmembranen, für die Dermatopharmazie von großem Interesse. Durch die direkte Messung fallen einerseits Fehlerquellen wie die aufwendige Probenaufarbeitung weg, andererseits steht durch die zerstö-

rungsfreie Analytik die Probe für Mehrfachmessungen zur Verfügung, wodurch eine äußerst exakte Erfassung der Kinetik der Penetrationsprozesse möglich wird.

Diesen Anforderungen werden spektroskopische bzw. optische Messverfahren in großem Umfang gerecht. Das generelle Grundprinzip besteht darin, elektromagnetische Strahlung (IR, VIS, UV) mit der Probe in Interaktion zu bringen und deren durch die Wechselwirkung von Strahlung und Materie bedingte energetische Veränderung zu detektieren. Es handelt sich somit um zerstörungsfreie, nicht-invasive, kontaktlose Messverfahren, die in der Regel keine Vorbereitung der Proben benötigen. Mit entsprechenden Vorrichtungen, wie Sonden oder Mikroskopen, können die Untersuchungen direkt am Objekt vorgenommen werden.

Hierzu zählen unter anderem Methoden der FTIR Spektroskopie (Fourier Transformation Infrarot) wie die FTIR-ATR Spektroskopie (abgeschwächte Totalreflexion) [5-8], die FTIR Mikroskopie [9] oder die FTIR-PA Spektroskopie (photoakustische Spektroskopie) [8, 10-12].

Laserspektroskopische Techniken stellen eine weitere sehr bedeutende Gruppe der optischen Messverfahren dar. Für Untersuchungen an Haut oder Modellmembranen wurden in den letzten Jahren verstärkt Fluoreszenz Mikroskopie und Methoden der Raman Mikroskopie verwendet und eindrucksvolle Ergebnisse erzielt [13-17].

Ogleich die Methoden der IR- und der Raman Mikrospektroskopie schon seit Jahren intensiv für diese Anwendungen erforscht werden – inzwischen existieren auch schon erste kommerzielle Geräte - hat bisher keine der Techniken alle an sie gestellten Erwartungen erfüllt. Limitierungen finden sich in der zum Teil niedrigen Nachweisempfindlichkeit oder aber in der hohen Empfindlichkeit gegenüber störenden Einflüssen. Und trotz der beschriebenen Vereinfachung der Gesamtanalytik, ergeben sich Schwierigkeiten bei der Dateninterpretation.

Eine weitere Gruppe von kontaktlosen Analysenverfahren basiert auf dem so genannten photothermischen Phänomen. Hierbei wird Strahlung einer Lichtquelle von Materie bzw. Molekülen absorbiert. Dadurch erhöht sich deren innere Energie und ein Teil dieser Anregungsenergie wird über strahlungslose Relaxation durch unelastische Stöße auf die Umgebung eines Moleküls, dies kann ein Feststoff, ein Gas oder ein Lösungsmittel sein, übertragen und führt zu einer Temperaturerhöhung, die mit geeigneten Temperatursensoren nachgewiesen werden. Erstmals beschrieb A. G. Bell diesen Effekt im Jahr 1880 in „On the Production and Reproduction of Sound by Light“ [18]. Erst in den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts konnten Bells Entdeckungen hinreichend erklärt [19] und verwendet werden, um Analysenverfahren für die Untersuchung von Feststoffen zu entwickeln [20-22]. In den letzten drei Jahrzehnten wurden verschiedene photothermische Methoden für eine Vielzahl von Anwendungen entwickelt. Nach fast hundertjähriger Pause erlebte die Photoakustik eine Renaissance durch Rosencwaig. Inzwischen gibt es ca. 15 Methoden, die sich prinzipiell durch ihre unterschiedlichen Detektionsverfahren unterscheiden.

Eine Variante der photothermischen Spektroskopie ist die photothermische Ablenkung (Photo-thermal Beam Deflection Spectroscopy = PDS). Die photothermische Ablenkung an Feststoffen wurde 1980 von Boccara [23] entdeckt und als „Mirageeffekt“ (franz. mirage = Fata Morgana) bezeichnet. Das Messprinzip der PDS ist außerordentlich einfach und beruht auf der thermischen Umsetzung von Licht (Laser oder konventionellen Lampen) durch die zu untersuchende Substanz. Die PDS ist ein äußerst variables und gleichzeitig robustes Messverfahren, welches grundsätzlich für Messungen an humaner Haut oder Modellmembranen einsetzbar ist. Im Vergleich zu radiometrischen Methoden wurde die PDS für derartige Untersuchungen bisher jedoch zurückhaltend eingesetzt [24-26]. Da nicht nur an der Grenzfläche einer Probe gemessen werden kann, sondern auch in tieferen Regionen, stellt die PDS eines der wenigen kontaktlosen Messverfahren dar, die die Erstellung von Tiefenprofilen ermöglichen. Somit könnte der Penetrationsprozess inklusive der transversalen und der lateralen Diffusion völlig kontaktlos, zerstörungsfrei und tiefenaufgelöst aufgenommen werden. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, die PDS für Penetrationsuntersuchungen nutzbar zu machen und die Möglichkeiten aber auch die Limitierungen dieser Technolo-

gie auszuloten. Außerdem soll die photothermische Ablenkung dabei mit verschiedenen Referenzmethoden verglichen werden.

1.2. Zielstellung

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- Die Erarbeitung der relevanten physikalischen Grundlagen und Zusammenhänge der photothermischen Spektroskopie.
- Identifizierung funktionaler Arzneistoff – Vehikel – Akzeptor - Systeme für die PDS Messungen.
- Die relevanten Einflussgrößen und Messparameter für die PDS zu ermitteln, anhand derer die Messprozedur optimiert werden kann.
- Die PDS mit Referenzmethoden (Raman Spektroskopie, FTIR-PA-Spektroskopie, FTIR-ATR-Spektroskopie) zu vergleichen und darauf basierend eine Bewertung vorzunehmen.
- Neben der Anpassung eines bereits vorhandenen photothermischen Messplatzes soll der Prototyp eines geeigneten photothermischen Scanners für eine spätere in-vivo-Anwendung entwickelt werden.
- Entwicklung von Experimenten, anhand derer Diffusionsprozesse transversal und lateral in Membranen photothermisch zu analysierbar sind und die Ermittlung von Kenngrößen wie dem Diffusionskoeffizienten.
- Zu untersuchen, inwieweit die theoretische Möglichkeit der Messung von Tiefenprofilen in der Praxis an relevanten Proben durchführbar ist.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Der photothermische Effekt

2.1.1. Photothermische Ablenkung an Feststoffen

Die erste Beobachtung des photothermischen Effektes gelang Anfang der achtziger Jahre des neunzehnten Jahrhunderts. Die Entstehung eines mit einem Hörrohr detektierbaren Geräusches aufgrund der periodischen Unterbrechung eines Lichtstrahls, welcher auf eine Festkörperprobe gerichtet war, veranlasste den Entdecker A.G. Bell einen Transfer von Schwingungen von der Oberfläche der Probe an die Gasphase anzunehmen, welcher Grundlage des Effektes sein sollte [18]. In folgenden Arbeiten aus dem Jahr 1881 beschreibt Bell weitere Experimente zu diesem Phänomen, wobei er einen Zusammenhang zwischen Lichtabsorption und photoakustischem Effekt bei Feststoffen, Flüssigkeiten und Gasen feststellte [27, 28]. Photothermischer und photoakustischer Effekt gehen aus identischen physikalischen Abläufen hervor. Da der photoakustische schließlich ein Resultat des photothermischen Effekts ist, wird Letzterer nachfolgend für beide Phänomene verwendet (Abb. 1). Allerdings blieben die Photothermik und die Photoakustik als analytische Messverfahren lange Zeit weitgehend unbeachtet. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts kam es dann zu Neuentwicklungen im Bereich der Messtechnik und der Optik. Aber auch insbesondere die neue Verstärkertechnik, Lichtquellen mit höherer Intensität und neue Detektorsysteme ließen eine Vielzahl von Messtechniken, die auf dem photothermischen Effekt basierten, entstehen (Tabelle 1). Maßgebliche Bedeutung für die Neubelebung der photothermischen Technologie hatte A. Rosencwaig, der in den 1970er Jahren spezielle photoakustische Techniken zur Anwendung an festen Materialien entwickelte [19, 29, 30]. Die neuen Methoden erlaubten nun auch die spektroskopische Untersuchung von opaken und stark streuenden Proben [31, 32] und gleichzeitig war es möglich thermische und mechanische Eigenschaften von Materialien ohne

aufwendige Probenvorbereitung zu ermitteln [33-35]. Rosencwaig erkannte bereits zu Beginn seiner Arbeiten, dass die Charakteristik dieser neuen, kontaktlosen und zerstörungsfreien Messverfahren ihnen ein enormes Potenzial für die Anwendung im Bereich klinischer Untersuchungen versprach [11]. Das Interesse an optischen Verfahren zur Untersuchung der Haut und der Penetration von Wirkstoffen in die Hautschichten war bereits vor 30 Jahren groß, was Rosencwaig veranlasste, erste photoakustische Studien an Stratum corneum Proben von Ratten vorzunehmen, wodurch er die Brauchbarkeit der Photoakustischen Spektroskopie für derartige Anwendungen zeigen konnte [36]. Während sich Rosencwaig vornehmlich auf die photoakustischen Verfahren konzentrierte, wurde die photothermische Ablenkungsspektroskopie erstmals 1980 von Boccara und Fournier vorgestellt [23]. Bereits im darauf folgenden Jahr erweitern Amodt und Murphy, die bereits den Mirage Effekt der Photothermik beschrieben hatten [37], die Theorie und die Anwendungen dieser neuen Methode und legten damit den Grundstein für die Einführung der PDS als analytisches Messverfahren für Oberflächenuntersuchungen [38]. Gleichzeitig entwickelte aber auch Boccara et al. die neue Technik weiter [39, 40]. In den folgenden Jahren konnte die PDS für zahlreiche neue Anwendungen eingesetzt werden. Insbesondere erlaubt dieses kontaktlose Verfahren ebenso wie die PAS zerstörungsfreie Tiefenmessungen an verschiedensten festen Materialien durchzuführen [41-43]. Die Bestimmung thermischer Materialeigenschaften wie die Temperaturleitfähigkeit oder die Wärmeleitfähigkeit gehört ebenso zu den Anwendungsgebieten der PDS [24, 33]. Neben der Ablenkung eines Laserstrahls beim Durchtritt durch die thermische Linse kann auch dessen Aufweitung gemessen werden (Thermal Lens Spektroskopie). Hier konnte die Photothermik als Spurenmethode für die Analytik von Toxinen in Wasser verwendet werden [44, 45].

Im Bereich biomedizinischer und biologischer Fragestellungen sind analytische Verfahren gefragt, welche die äußerst empfindlichen Proben möglichst nicht beeinflussen oder gar zerstören. Mit der Einführung von PDS und PAS als kontaktlose, nicht-invasive Messverfahren fanden beide Methoden schnell Verwendung zur Untersuchung sensibler Proben. Leblanc et al. führte Studien zur Aufklärung photosynthetischer Aktivität mittels PDS Messungen an intakten Blättern durch [46].

Tabelle 1. Photothermische Techniken [47]

Abkürzung	Technik
ETEAM	Electron Thermoelastic Acoustic Microscopy
FTIR PAS	Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy
OBD	Optical Beam Deflection
PAM	Photoacoustic Microscopy
PARAS	Photoacoustic Reflection Absorption Spectroscopy
PAS	Photoacoustic Spectroscopy
PDS	Photothermal Deflection Spectroscopy
PIM	Photo Infrared Microscopy
PTOBD	Photothermal Optical Beam Deflection
PTR	Photothermal Radiometry
SEAM	Scanning Electron Acoustic Microscopy
SPAM	Scanning Photoacoustic Microscop
TDTL	Time-Dependent Thermal Lensing
TRIR	Time-Resolved Infrared Radiometry
TROA	Time-Resolved Optoacoustics

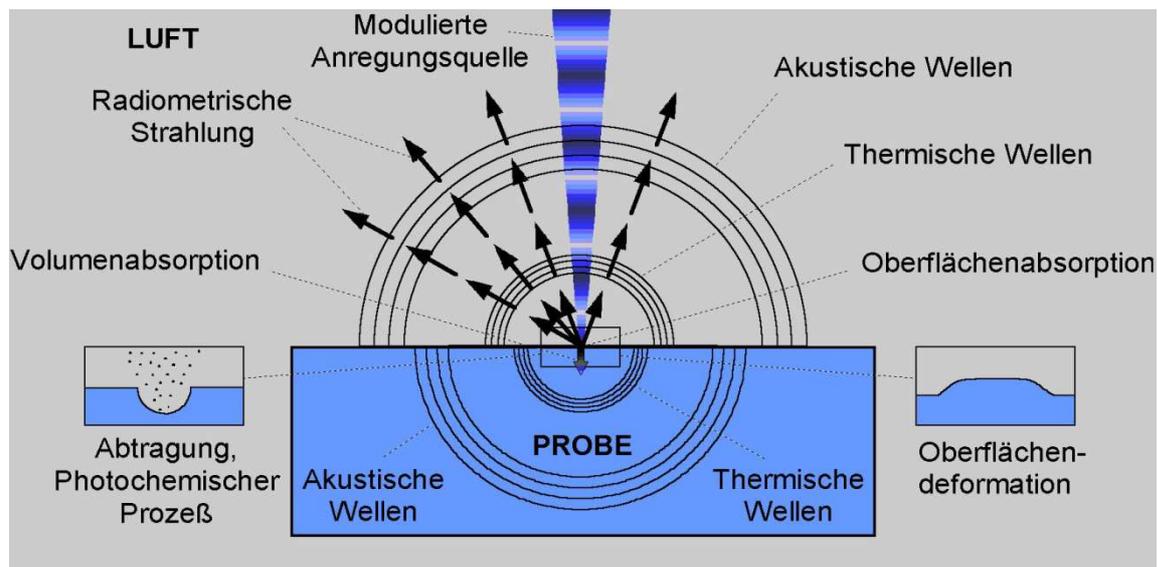


Abbildung 1. Physikalische Effekte der Anregung einer Probe mit intensitätsmodulierter elektromagnetischer Strahlung [48]. Durch die modulierte Bestrahlung eines Materials kommt es infolge von Absorption sowohl in der Probe, als anschließend auch in der angrenzenden Gasphase zur Ausbreitung thermischer und akustischer Wellen.

Die photothermische Auswertung eines Immuntests mit enorm niedriger Nachweisgrenze gelang Sakashita et al. [49]. Giese und Kölmel et al. beschäftigten sich in den 1980 und 1990er Jahren mit der Anwendung photothermischer und photoakustischer Techniken für dermatologische Untersuchungen. Diese Arbeitsgruppe war bisher die einzige, die die erfolgreiche Anwendung der PDS in diesem Bereich mehrfach veröffentlichte. So wurde die Penetration von UV-Schutzsubstanzen und von Vitamin E in die humane Haut unter *in vivo* Bedingungen mittels PDS verfolgt [24, 50, 51].

Das Prinzip photothermischer Technik beruht, wie weiter oben bereits erwähnt, auf der Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen (z.B. sichtbares Licht, meistens in Form eines Lasers) auf eine Probe. Die Absorption der Anregungsstrahlung (Anregungslasers) resultiert in einer Temperaturerhöhung eines kleinen Volumens des Probenmaterials. Die Erwärmung anliegender Bereiche der Probe sowie der angrenzenden Gasphase erfolgt durch Wärmeleitung. Die Temperaturabhängigkeit des Brechungsindex n lässt oberhalb der Probe einen thermisch induzierten Brechungsindexgradienten entstehen. Dieses Phänomen wird auch Mirage Effekt genannt und wird im Sommer über erhitztem Straßenbelag sichtbar. Wird eine Quelle von ausreichender Intensität und mit konstanter Intensitätsmodulation verwendet, entsteht im Bereich um den Aufttrittspunkt des Anregungsstrahls sowohl in der Probe, als auch in der die Probe begrenzenden Gasphase ein stationäres, stabiles Temperaturfeld (Abb. 2). Dieser Bereich wird auch als thermische Linse bezeichnet.

Der thermisch induzierte Gradient des Brechungsindex lenkt einen zweiten (Detektions-) Strahl, der parallel zur Probenoberfläche durch die thermische Linse verläuft, ab. Das Ausmaß der Ablenkung des Detektionsstrahls wird durch das Temperaturprofil der Oberfläche des Materials bestimmt, welches wiederum durch die optischen und thermischen Eigenschaften der Probe bedingt wird. Die Ablenkung des Messlasers kann mit einem positionsempfindlichen Detektor gemessen werden. Abbildung 2 zeigt, dass die Ablenkung aus zwei Komponenten (bezeichnet mit θ_n und θ_t) besteht, die verschiedenartige komplementäre Informationen über das Temperaturfeld der Probe

beinhalten. Die normale Ablenkung (normal bzw. senkrecht zur Oberfläche) ist besonders sensitiv für Änderungen der Oberflächentemperatur des Probenkörpers. Die transversale Komponente (parallel zur Oberfläche) wird durch das Temperaturprofil orthogonal zum Detektionsstrahl beeinflusst.

Die thermische Linse, die sich oberhalb der bestrahlten Oberfläche aufbaut, entsteht aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Brechungsindex von Luft, dn/dT . Der Zahlenwert von dn/dT ist negativ und resultiert in einer Ablenkung des Detektionsstrahls, die weg von der Oberfläche gerichtet ist. Die Ablenkung an jedem Punkt entlang des Strahlengangs ist [47]:

$$d\theta = n^{-1} \nabla n \times dl \quad (1)$$

Dabei beschreibt dl einen inkrementellen Vektor entlang des Strahlenweges. Die Gesamtablenkung des über das erwärmte Medium geleiteten Lasers ergibt sich zu:

$$\theta = \int n^{-1} \nabla n \times dl \quad (2)$$

Es wird entlang des Strahlenverlaufs integriert. Die eigentlichen Zahlenwerte des Ablenkungswinkels sind sehr klein und werden erst durch die Hebelwirkung der Strecke des Messlasers l_a zwischen der thermischen Linse und dem Detektor registrierbar.

Für das photothermische Signal ergibt sich:

$$S = l_a \int n^{-1} \nabla n \times dl \quad (3)$$

Da der Brechungsindex temperaturabhängig ist, gilt $\nabla n = (dn/dT_g) \nabla T$, wobei T_g die Temperatur im Gas ist. Da der Wert für $n^{-1}(dn/dT_g)$ entlang des Strahlenverlaufs konstant bleibt, kann der Ausdruck vor das Integral gezogen werden. Fasst man alle Faktoren, die entlang des Strahlengangs konstant bleiben, als K_0 zusammen, ergibt sich für das photothermische Signal (PD Signal)

$$S = K_0 \int \nabla T_g \times dl \quad (4)$$

Wie bereits weiter oben erwähnt, kann der Ablenkungswinkel in zwei Teile zerlegt werden. Dies gilt somit auch für das PD Signal. Für dessen normale Signalkomponente gilt:

$$S_n = K_0 \frac{\partial}{\partial z} \int T_g dx \quad (5)$$

und für die transversale Signalkomponente gilt:

$$S_t = K_0 \frac{\partial}{\partial y} \int T_g dx \quad (6)$$

Für das dreidimensionale System gilt:

$$\int T_g dx = \int T_g(v_t) \cos(v_t, y) dv_t \quad (7)$$

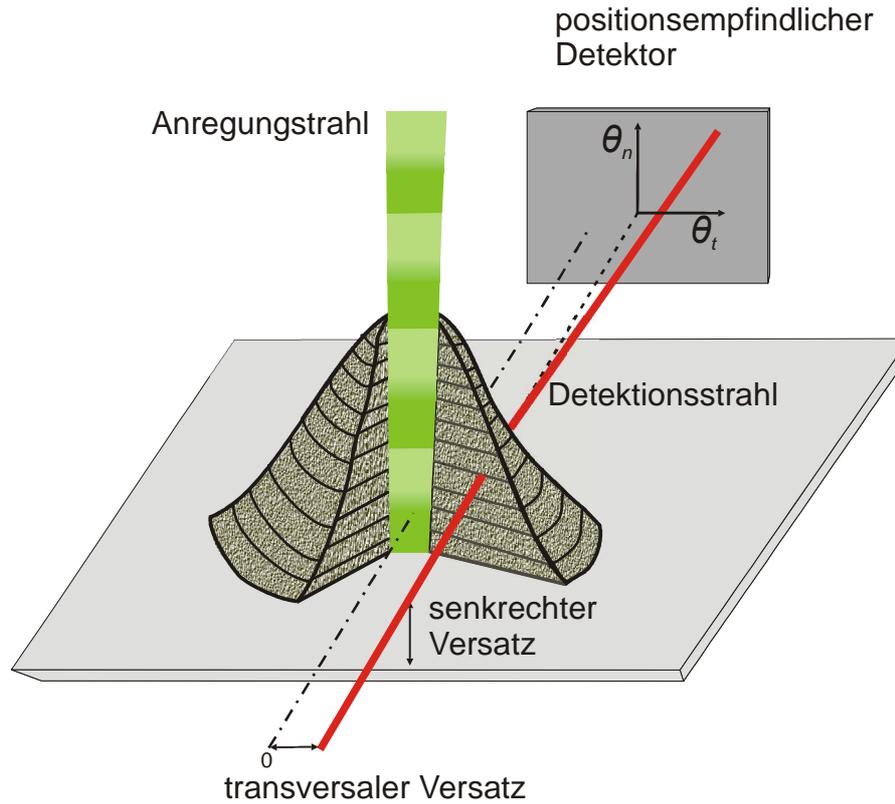


Abbildung 2. Photothermische Ablenkung

Die schematische Darstellung der Technik der PDS zeigt den Detektionsstrahl, der die durch den Anregungsstrahl induzierte thermische Linse parallel zur Oberfläche passiert. Dabei erfährt der Detektionsstrahl eine Ablenkung, welche auf dem Detektor in ihren zwei Komponenten θ_n und θ_t dargestellt ist. Der Messlaser verläuft in einem konstanten Abstand y zum Zentrum der thermischen Linse (transversaler Versatz). Die Höhe des Strahlenverlaufes parallel über der Oberfläche wird als normaler oder senkrechter Versatz z_n bezeichnet.

Werden die Gleichungen (5) und (6) für dreidimensionale Systeme geschrieben, ergibt sich:

$$S_n = K_0 \int \frac{\partial T_g(v_t)}{\partial z} \cos(v_t y) dv_t \quad (8)$$

und

$$S_t = K_0 \int v_t T_g(v_t) \sin(v_t y) dv_t \quad (9)$$

Der Vektor v_t liegt in der transversalen Ebene, parallel zur Probenoberfläche, somit beschreibt $T_g(v_t)$ die Temperatur in dieser Ebene. Wird die Temperatur im Gas auf die Oberflächentemperatur bezogen, ergibt sich:

$$T_g = T_s \exp\left(-\frac{z_n}{\mu_g}\right) \quad (10)$$

Die Temperatur der Oberfläche wird mit T_s bezeichnet, μ_g ist die thermische Diffusionslänge von Luft und z_n ist der normale Versatz des Messlasers. Es ergibt sich für die normale Ablenkung des Detektionslasers:

$$S_n = K_0 \int \frac{T_s(v_t)}{\mu_g} \exp\left(\frac{z_0}{\mu_g}\right) \cos(v_t y) dv_t \quad (11)$$

Und die transversale Ablenkung ist:

$$S_t = K_0 \int v_t T_g(v_t) \left(\frac{z_0}{\mu_g}\right) \sin(v_t y) dv_t \quad (12)$$

Aus den genannten Gleichungen lässt sich ableiten, dass die normale Komponente der Ablenkung direkt von der Temperaturverteilung entlang des Weges des Detektionslasers abhängt, wohingegen die transversale Komponente vom Temperaturgradienten in transversaler Ausrichtung beeinflusst wird. Somit ergeben sich, je nachdem welche der beiden Signalkomponenten detektiert wird, differenzierte Sensitivitäten für bestimmte Probeneigenschaften.

2.1.2. Thermische Wellen

Die korrekte Anwendung der in Tabelle 1 aufgezählten Methoden erfordert zuerst ein Grundverständnis der physikalischen Prozesse, auf denen das photothermische Prinzip basiert. Infolgedessen wird in Abschnitt 2.1.2 zunächst der Fokus auf die Grundlagen der Wärmeleitung in Feststoffen gelegt, wozu im Folgenden auch im pharmazeutischen Sinn halb festen Formulierungen zählen. Anschließend folgen die Einführung des Prinzips thermischer Wellen und ihrer Wechselwirkungen in Feststoffen. Die Erzeugung thermischer Wellen mit Hilfe optischer Quellen soll abschließend die theoretischen Betrachtungen zu thermischen Wellen vervollständigen.

2.1.2.1. Grundlagen des Wärmetransports und Wärmeleitung

Die Übertragung und Ausbreitung von Wärme gehören zu den grundlegenden Vorgängen des Wärmetransports. Als Ergebnis dieser Prozesse wird ein Temperaturfeld erhalten. Es liefert die genaue Beschreibung der Temperaturverteilung in einem Medium. Das Temperaturfeld

$$T = T(x, t)$$

in seiner räumlichen und zeitlichen Abhängigkeit zu bestimmen, bedeutet Wärmeleitprobleme lösen zu können. Die grundlegende Differenzialgleichung für das Temperaturfeld kann durch Verknüpfung des Energieerhaltungssatzes mit dem Gesetz von Fourier erhalten werden.

Temperaturunterschiede in einem Medium oder zwischen zwei Körpern sind der Ausgangspunkt für den Transport von Wärme. Ein solcher Transport kann in Form von Wärmeleitung, Konvektion oder Abstrahlung von Wärme stattfinden. Fouriers Gesetz beschreibt die durch Leitung bedingte Rate des Wärmetransports pro Flächeneinheit bzw. den Wärmestrom q_{cd} [Wm^{-2}] in x-Richtung.

$$q_{cd} = -\kappa \frac{\partial T}{\partial x} \quad (13)$$

Der Proportionalitätsfaktor κ ist bekannt als Wärmeleitfähigkeit oder thermische Leitfähigkeit [$\text{W m}^{-1}\text{K}^{-1}$] und beeinflusst den Wärmestrom als stoffabhängige Konstante maßgeblich. Fouriers Gesetz erlaubt, die durch Wärmeleitung bedingten Wärmeströme an jedem Punkt zu beschreiben. Da bei photothermischen Experimenten die erzeugten Temperaturunterschiede sehr klein sind, genügt es die Effekte der thermischen Leitfähigkeit zu betrachten [52].

Um einen Zugang zur äußerst komplexen räumlichen und zeitlichen Temperaturverteilung in einer Probe zu erhalten, kann die Anwendung einer Form des Energieerhaltungssatzes auf ein würfelförmiges Kontrollelement bzw. Kontrollvolumen (dV) herangezogen werden [53]. Die Anwendung des Energieerhaltungsprinzips auf die Energieflüsse in das und aus dem Volumenelement dV (dx , dy und dz) führt zu folgendem Ausdruck:

$$Q_{in} + Q_g - Q_{out} = Q_{st} \quad (14)$$

Q_{in} ist der Anteil des Energiestroms in dV

$$Q_{in} = q_x + q_y + q_z$$

Q_g ist der Anteil der in dV generierten Energie

$$Q_g = g dx dy dz$$

Q_{out} ist der Anteil des Energiestroms aus dV heraus

$$Q_{out} = q_{x+dx} + q_{y+dy} + q_{z+dz}$$

Q_{st} ist die gespeicherte Energie in dV

$$Q_{st} = \rho c_w \frac{\partial T}{\partial t} dx dy dz$$

ρ ist die Dichte, c_w steht für die spezifische Wärmekapazität der Probe und g die generierte Energiemenge pro Volumeneinheit. Nun wird Q_{st} in Gleichung (14) ersetzt. Fourier's Gesetz (13) wird auf den Wärmefluss in jeder Dimension q_x , q_y und q_z angewendet. Der Anteil der Wärmeenergie, der dV verlässt q_{x+dx} , q_{y+dy} und q_{z+dz} wird mittels Taylor Expansion erhalten. Durch Einsetzen in die Energieerhaltungsgleichung (14) wird die generelle Form der Wärmediffusionsgleichung bzw. Wärmeleitungsgleichung erhalten:

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(\kappa dy dz \frac{\partial T}{\partial x} \right) dx + \frac{\partial}{\partial y} \left(\kappa dx dz \frac{\partial T}{\partial y} \right) dy + \frac{\partial}{\partial z} \left(\kappa dx dy \frac{\partial T}{\partial z} \right) dz + g dx dy dz = \rho c_w \frac{\partial T}{\partial t} dx dy dz \quad (15)$$

Diese Formel bildet die Grundlage für die Analytik der Wärmeleitung und ermöglicht die Temperaturverteilung als Funktion der Zeit zu erhalten. Somit beinhaltet die Wärmediffusionsgleichung die Aussage, dass an jedem Punkt eines Mediums die Menge an ein- und ausgeleiteter Wärmeenergie plus der Menge an erzeugter Wärmeenergie pro Volumeneinheit der Änderung der gespeicherten Energie entsprechen.

Die äußerst komplexe Wärmediffusionsgleichung kann für verschiedene Spezialfälle vereinfacht geschrieben werden.

Ist die thermische Leitfähigkeit in einem Medium isotrop, vereinfacht sich die Gleichung wie folgt:

$$\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + \frac{g}{\kappa} = \frac{1}{\alpha} \frac{\partial T}{\partial t} \quad (16)$$

Dabei ist α die thermische Diffusivität bzw. Temperaturleitfähigkeit (m^2s^{-1}). Diese wichtige, thermophysikalische Größe ergibt sich aus dem Verhältnis von thermischer Leitfähigkeit und Kapazität. Sie beschreibt das Ausmaß, mit dem sich Wärme in einem Material verteilt. Wobei dieser Prozess nicht nur durch die thermische Leitfähigkeit beeinflusst wird, sondern auch durch Kapazität des Mediums Wärme zu speichern.

Findet in einem Medium keine interne Generierung von Wärme statt, vereinfacht sich die Wärmediffusionsgleichung wie folgt:

$$\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} = \frac{1}{\alpha} \frac{\partial T}{\partial t} \quad (17)$$

Weitere Vereinfachungen werden für stationäre Temperaturfelder und für das Fehlen von Wärmequellen erzeugt.

Betrachtet man die Wärmeleitungsgleichung für einen Körper mit konstanten Stoffwerten, das heißt die Wärmeleitfähigkeit $k = \text{konst.}$ und die spezifische Wärmekapazität $c_w = \text{konst.}$, in dem außerdem keine Wärmequellen auftreten und das Temperaturfeld nur noch von der Zeit t und der x -Koordinate abhängt, spricht man von linearem Wärmefluss und es gilt folgende Differenzialgleichung:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \quad (18)$$

Anhand von Gleichung (18) lassen sich die Temperaturleitfähigkeit und die Wärmeleitungsgleichung anschaulich erläutern. Danach ist die zeitliche Temperaturänderung $\partial T / \partial t$ an jeder Stelle des Mediums der Temperaturleitfähigkeit proportional. Diese Materialeigenschaft gibt also an wie schnell sich Temperaturen ändern. In Tabelle 2 sind thermische Materialeigenschaften für diverse Stoffe aufgeführt. Es wird deutlich, dass Metalle generell mit hohen Temperatur- und Wärmeleitfähigkeitswerten ausgestattet sind [52]. Das bedeutet, dass sie nicht nur gute Wärmeleiter sind, sondern auch Temperaturänderungen schnell weitergeben. Dagegen liegen die Werte für die thermische Diffusivität und die Wärmeleitfähigkeit organischer Materialien zum Teil um den Faktor 1000 niedriger.

Zudem verknüpft die Differenzialgleichung (18) die zeitliche Änderung der Temperatur mit der Krümmung des Temperaturverlaufs an einer Stelle. Dabei sind drei Fälle zu unterscheiden.

Ist $\partial^2 T / \partial x^2 \geq 0$, steigt die Temperatur (Erwärmung), da mehr Energie nachströmt als abgeführt wird. So muss Energie gespeichert werden, weshalb die Temperatur mit der Zeit ansteigt. Bei entgegen gesetztem Vorzeichen der Krümmung $\partial^2 T / \partial x^2 \leq 0$ sinkt die Temperatur mit der Zeit, während für $\partial^2 T / \partial x^2 = 0$ die Temperatur konstant bleibt (stationäres Temperaturfeld) [54]. Stationäre Temperaturfelder sind unabhängig von der Zeit, da sie einen Endzustand eines nichtstationären Aufheiz- oder Abkühlvorgangs darstellen. Es gilt $\partial T / \partial t = 0$.

Tabelle 2. Thermophysikalische Eigenschaften ausgesuchter Materialien [52, 55, 56].

Material	Dichte	Wärme- kapazität	Wärmeleit- fähigkeit	Temperatur- leitfähigkeit	Wärmeein- dringungs- koeffizient	Thermische länge (mm)		Diffusions- koeffizient
	(kg m ³)	(Jkg ⁻¹ K ⁻¹)	(Wm ⁻¹ K ⁻¹)	(x10 ⁻⁶ m ² s ⁻¹)	(Ws ^{1/2} m ⁻² K ⁻¹)	1Hz	25Hz	
Aluminium	2700	945	238	93,28	24642,59	5,449	1,089	0,544
Kupfer	8933	385	401	116,60	37136,52	6,092	1,218	0,609
Eisen	7870	447	80,2	22,80	16796,87	2,694	0,539	0,269
Silber	10500	235	429	173,86	32535,48	7,439	1,488	0,744
Silizium	2330	712	148	89,21	15669,27	5,329	1,066	0,533
Kaut- Schuk	1100	2010	0,13	0,06	536,12	0,137	0,027	0,014
Holz (Ei- che)	545	2385	0,17	0,13	470,07	0,204	0,041	0,020
Luft	1,16	1007	0,026	22,26	5,51	2,662	0,532	0,266
Wasser	1,00			0,14		0,211	0,042	0,021

2.1.2.2. Erzeugung und Ausbreitung thermischer Wellen in einem stationären Temperaturfeld

In Natur und Technik treten periodische Temperaturänderungen häufig auf, wie zum Beispiel die täglichen oder jahreszeitlichen Schwankungen der Bodentemperatur. Analytische Verfahren, welche auf dem photothermischen Effekt basieren, verwenden ebenso meist intensitätsmodulierte Wärmequellen, um eine Probe anzuregen. Die daraus resultierenden periodischen Temperaturschwankungen erzeugen ein stationäres, konstantes Temperaturfeld in der Probe und in der angrenzenden Gasphase, wodurch eine Analytik dieses Phänomens erst ermöglicht wird. Im Folgenden sollen diese Temperaturschwankungen und die Theorie thermischer Wellen näherungsweise erläutert werden.

Als Modell dient ein Körper mit konstanten Stoffwerten α und κ . An die freie Oberfläche $x = 0$ grenzt eine Wärmequelle, deren Temperatur T_w sich wie folgt ändert [54]:

$$T_w(t) = T_m + \Delta T \cos \omega t = T_m + \Delta T \cos \left(2\pi \frac{t}{t_s} \right) \quad (19)$$

Es wird also von einer harmonisch schwingenden Temperaturänderung mit der Amplitude ΔT und der Schwingungsdauer t_s um den Mittelwert T_m ausgegangen. Gesucht ist das Temperaturfeld $T = T(x, t)$, welches sich in der Probe nach längerer Zeit als Dauerzustand einstellt. Auch im Inneren des Körpers werden die Temperaturen eine harmonische Schwingung ausführen, die mit zunehmender Tiefe x immer stärker gedämpft wird und außerdem eine Phasenverschiebung zeigt. Ein entsprechender Ansatz

$$T(x, t) = T_m + \Delta T \eta e^{-\mu x} \cos(\omega t - \mu z - \varepsilon) \quad (20)$$

erfüllt die Wärmediffusionsgleichung (18), wenn

$$\frac{1}{\mu^2} = \frac{\omega}{2\alpha} = \frac{\pi}{\alpha t_0}$$

ist [54]. Die Bedeutung der Konstanten η und ε wird erkennbar, wenn man ausgehend von Gleichung (8) die Oberflächentemperatur ($x = 0$) berechnet:

$$T(0,t) = T_m + \Delta T \eta (\alpha t - \varepsilon) \quad (21)$$

Die Temperatur der Oberfläche des Festkörpers läuft der Temperatur der Wärmequelle um den Winkel ε nach. Wohingegen die Amplitude dieser Schwingung um den Faktor $\eta < 1$ gegenüber der Schwingung der Wärmequelle verkleinert ist (Vgl. Abb. 3). Ebenso verhält sich die Temperatur in einer bestimmten Tiefe z . Sie schwingt mit derselben harmonischen Kreisfrequenz ω und zeigt mit zunehmender Tiefe z eine stärker werdende Abschwächung ihrer Amplitude sowie eine zunehmende Phasenverschiebung. Gleichung (20) stellt somit für jeden Zeitpunkt eine in das Innere des Körpers wandernde, mit zunehmender Tiefe abklingende Temperaturwelle dar. Wie für elektromagnetische Wellen kann auch für die thermische Welle eine Wellenlänge λ_{th} als Abstand zweier Punkte, deren Phasenwinkel sich um 2π unterscheiden, angegeben werden.

$$\lambda_{th} = z_2 - z_1 = 2\sqrt{\pi\alpha \cdot t_0} \quad (22)$$

Um die Eindringtiefe der Temperaturschwingung zu beurteilen, wird die Tiefe z_n , in der die Amplitude auf den n -ten Teil ihres Wertes an der Oberfläche gesunken ist, berechnet:

$$z_n = \frac{\lambda_{th}}{2\pi} \ln n = \sqrt{\frac{\alpha \cdot t_0}{\pi}} \ln n \quad (23)$$

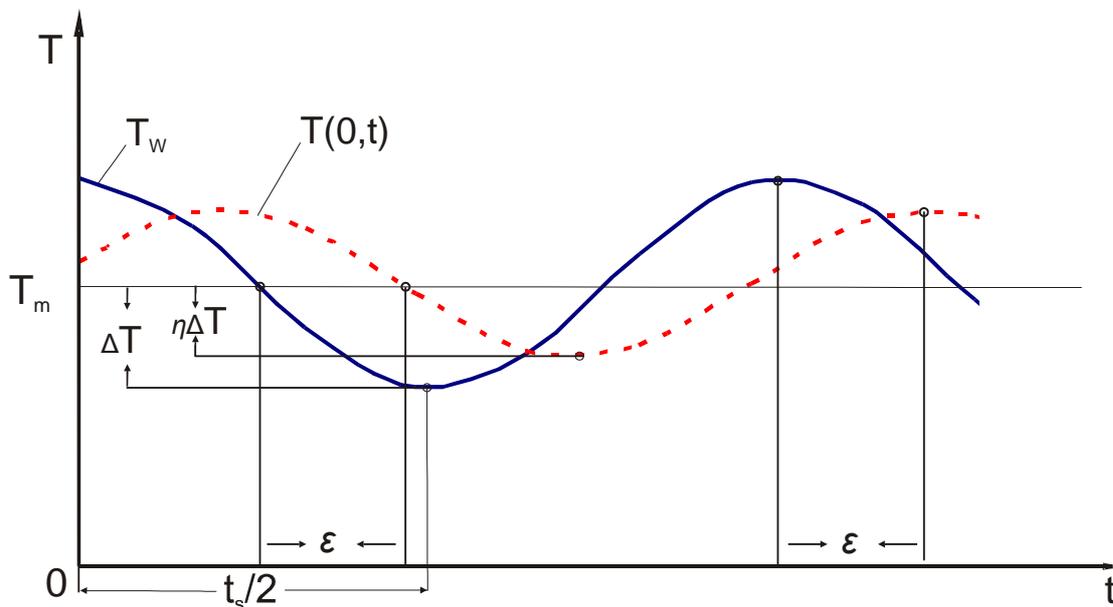


Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der Temperatur der Wärmequelle T_w nach Gleichung (20) und der Oberflächentemperatur der Probe $T(0,t)$ nach Gleichung (21).

Für $n = e$, erhält man für z_n einen Wert, der als thermische Diffusionslänge μ beschrieben ist.

Die thermische Diffusionslänge ist die Eindringtiefe einer thermischen Welle, bei welcher deren Amplitude auf $1/e$ ihrer Amplitude an der Oberfläche gefallen ist. Die Eindringtiefe und die Wellenlänge der thermischen Welle nehmen mit der Temperaturleitfähigkeit des Körpers zu. Hochfrequente Schwingungen haben eine geringere Eindringtiefe in Festkörper als Schwingungen mit niedriger Frequenz.

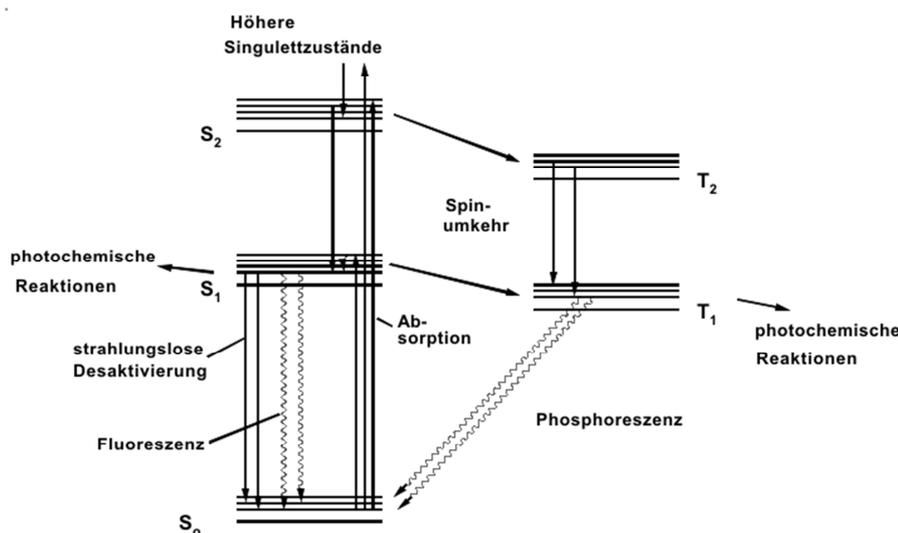
2.1.2.3. Optische Erzeugung thermischer Wellen – der photothermische Effekt

Wie Tabelle 1 in Abschnitt 2.1.1 verdeutlicht, existiert eine Vielzahl von photothermischen Methoden, die sich in der Form der Detektion des Messsignals aber auch in der Art der Probenanregung unterscheiden. Gleichwohl verwendet mittlerweile die Mehrheit dieser Techniken eine elektromagnetische Strahlungsquelle zur Erzeugung thermischer Wellen in der Probe. Heute ist die am häufigsten verwendete Quelle ein Laserstrahl, dessen Lichtenergie von der Probe absorbiert und in Wärme umgewandelt wird. Die Verwendung von Laser-Strahlungsquellen bringt enorme Vorteile hervor: Die Probenanregung kann kontaktlos erfolgen und mit sehr hoher Ortsauflösung. Des Weiteren können, wenn auch eingeschränkt, spektrale Daten der Probe erhalten werden.

Die Verwendung optischer Quellen bedeutet aber auch, dass nicht nur die thermischen, sondern auch die optischen Eigenschaften einer Probe den photothermischen Effekt beeinflussen. So können nach dem Auftreffen der Strahlung auf die Oberfläche Reflexion, Absorption, Interferenzen in dünnen Oberflächenschichten und Streuung auftreten. Auf die Bedeutung dieser Phänomene für den photothermischen Effekt soll im Folgenden eingegangen werden.

Absorption

Ausgangspunkt des photothermischen Effekts ist zunächst die Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch Materie. Das vereinfachte Termschema nach Jablonski (Abb. 4) verdeutlicht, welche Prozesse bei der Wechselwirkung von Materie und Strahlung berücksichtigt werden müssen.



Termschema (Jablonski-Diagramm)

Abbildung 4. Elektronische Zustandsformen bei der Absorption von Licht.

Moleküle unterschiedliche energetische Zustände einnehmen. Je nach Zahl des Gesamtspins wird unterschieden in Singulett- (S_i) und Triplett-Zustand (T_i). Ein Molekül wird optisch angeregt, wenn die Energie des anregenden Photons gleich der Energiedifferenz zwischen dem Singulettzustand S_0 und einem angeregten Zustand S_i ist. Für die Desaktivierung des Moleküls gibt es verschiedene Möglichkeiten. Während die Desaktivierung bei der Fluoreszenz und der Phosphoreszenz unter Emission von Strahlung abläuft, kann die Energie auch in photochemische Reaktionen fließen oder wie bei der strahlungslosen Desaktivierung unter Wärmeentwicklung von Statten gehen. Letzteres geschieht durch die innere Umwandlung „*internal conversion*“ von einem Energieniveau in ein niedrigeres. Die frei werdende Energie fließt in einen höheren Vibrationszustand und wird durch Stöße des Moleküls an seine Umgebung in Wärme umgewandelt.

Die sich entwickelnde Wärme breitet sich in der Materie aus und wird an der Grenzfläche Probe/Gasphase an die äußere Phase transferiert. Die Absorption elektromagnetischer Strahlung des infraroten Bereichs regt hingegen keine Übergänge von Valenzelektronen an, sondern Moleküle mit ausgeprägtem Dipolmoment können mit IR Strahlung in Wechselwirkung treten, indem die Molekülbindungen energetisch höhere Schwingungszustände einnehmen. Die erworbene Energie wird durch Stöße an benachbarte Atome weitergegeben, wodurch Wärme frei wird.

Absorption und Reflektion an Oberflächen

Fällt ein elektromagnetisches Feld, z.B. ein Laserstrahl, auf einen Körper, wird ein Teil davon reflektiert. Der Rest der Strahlung gelangt durch das Medium hindurch bzw. dringt in den Körper ein. Sämtliche Stoffe absorbieren außerdem einen Teil der durch sie hindurchgehenden Strahlung, wobei die Strahlungsenergie in eine andere Energieform umgewandelt wird. Im Allgemeinen entsteht Wärme.

Reflektion $R(\lambda)$ und Transmission $T(\lambda)$ können beschrieben werden als [52]:

$$R(\lambda) = \left| \frac{1 - N(\lambda)}{1 + N(\lambda)} \right|^2 \quad T(\lambda) = \left| \frac{2N(\lambda)}{1 + N(\lambda)} \right|^2 \quad (24)$$

Wobei $N = n' + jn$ den komplexen Brechungsindex des Materials darstellt. Die Koeffizienten n' und n stehen für die Abschwächung und den Brechungsindex. Die Intensität der einfallenden elektromagnetischen Strahlung nimmt in einem opaken Medium mit der Tiefe z exponentiell ab (Abb. 5):

$$\frac{E_t(z)}{E_i} = \exp(-\beta z) \quad (25)$$

Der optische Absorptionskoeffizient β ergibt sich zu

$$\beta = \frac{4\pi n}{\lambda} \quad (26)$$

Das Reziproke des Absorptionskoeffizienten $1/\beta$ wird als optische Absorptionslänge l_β bezeichnet und beschreibt die Strecke nach der die einfallende Strahlung auf $1/e$ ihrer Amplitude an der Oberfläche gefallen ist. Für ein nicht absorbierendes Material ist $n = 0$.

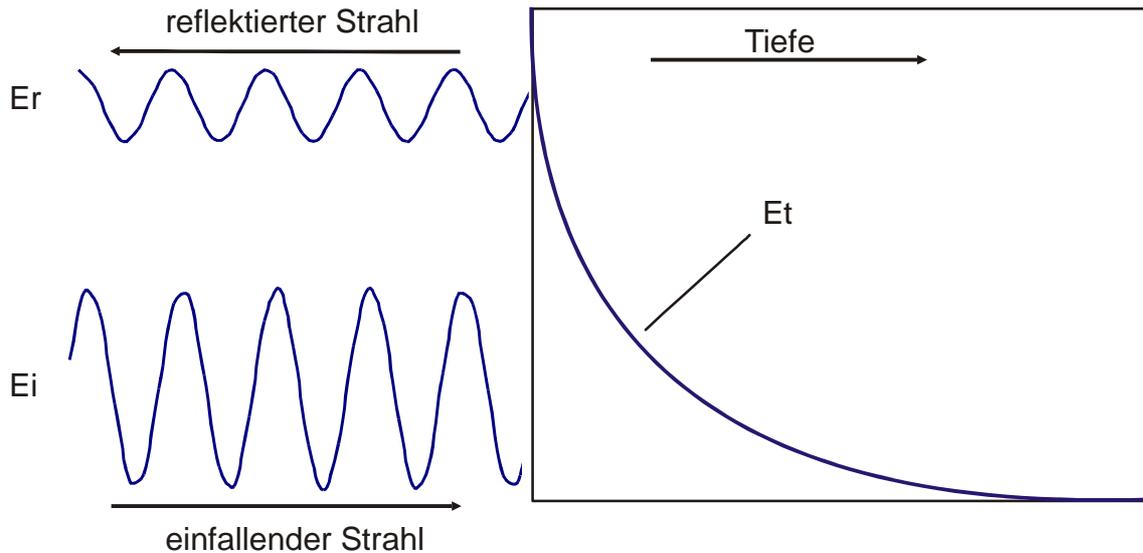


Abb. 5 Reflexion (E_r) und Abschwächung (E_t) eines elektromagnetischen Feldes (E_i) an der Oberfläche eines Festkörpers.

Tabelle 3: Wellenlängenabhängigkeit der optischen Eigenschaften von Festkörpern

Spektraler Bereich	Metall (z. Bsp. Al)	Halbleiter (z. Bsp. Si)	Isolator (z. Bsp. SiO ₂)
UV ($\lambda \approx 50-300\text{nm}$)	$R \approx 0-92\%$	$R \approx 40-60\%$, große Polarisierbarkeit	Bandkante
VIS, NIR ($\lambda \approx 300-3000\text{nm}$)	$R \approx 92-95\%$	Teilweise reflektierend und absorbierend	Transparent
$\lambda > 10000\text{nm}$	$R \approx 100\%$	Transparent	Reststrahlen, hohe Absorption und Reflexion

Die optische Absorptionslänge variiert für verschiedene Materialgruppen und Wellenlängen sehr stark. Bei einer Wellenlänge von $1 \mu\text{m}$ beträgt l_β für Metalle lediglich einige Nanometer. In Halbleitermaterialien kann diese Strahlung schon Hunderte von μm eindringen und für Isolatoren liegt dieser Wert bei mehreren Millimetern. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der photothermische Effekt in Metallen nur auf deren Oberfläche punktuell erzeugt wird, wohingegen diese Annahme für Halbleiter und Isolatoren nicht gilt.

Im Bereich der IR Strahlung zeigen besonders Metalle eine starke Reflexion, welche sich über die Halbleiter bis zu den Isolatoren zu Gunsten der Absorption deutlich abschwächt. Bei abnehmender Wellenlänge sinkt auch der reflektierte Anteil der Strahlung auf metallischen Oberflächen. Transparentes Verhalten und stark wellenlängenabhängige Absorption zeigen dagegen Isolatoren bei kürzer werdender Wellenlänge (Tab. 3). Die Durchführung photothermischer Messungen erfordert in den Festkörper eingebrachte Energiemengen, die ausreichen, um eine genügende Erwärmung zu erzeugen. Somit sollten eine hohe Absorption und eine geringe Reflexion vorliegen, um ein effektives Erwärmen zu ermöglichen. Für die Realisierung muss je nach zu untersuchendem Material die optimale Anregungsquelle gefunden werden.

Absorption in tieferen Schichten

Zahlreiche nicht-metallische Materialien absorbieren elektromagnetische Strahlung und wandeln sie in Wärme um. Der Absorptionsprozess ist hier eher durch Atom- oder Molekülübergänge gekennzeichnet als durch Übergänge freier Elektronen. Generell dringen elektromagnetische Wellen tiefer in nicht-metallische Materialien ein und somit kann der photothermische Effekt bei solchen Körpern nicht als reiner Oberflächeneffekt angesehen werden. Vielmehr wird in verschiedenen Tiefen z der Probe Wärme erzeugt. Will man die Wärmeenergie, die in einem Element der Länge dz in der Tiefe z in einem absorbierenden Medium erzeugt wird beschreiben, ergibt sich [52]:

$$\Delta Q(z) = -\tau \frac{dI(z)}{dz} dz = \tau [1 - R(\lambda)] I_0 \beta \exp(-\beta z) dz \quad (27)$$

Wobei eine exponentiell verlaufende Abschwächung der einfallenden Lichtintensität I im Medium und die Oberflächenreflektivität $R(\lambda)$ angenommen werden. β ist der optische Absorptionskoeffizient und τ ist der Licht in Wärme Umwandlungskoeffizient des Materials. Letztere Größe wird für alle Feststoffe als gleich angenommen. Die Amplitude einer solchen Wärmequelle fällt mit der Tiefe z exponentiell ab. Die Amplituden thermischer Wellen, die auf diese Art generiert werden, hängen somit sowohl von der thermischen Diffusionslänge μ (Gl. 23), als auch von der optischen Absorptionslänge l_β ab. Die resultierende Modulation der Oberflächentemperatur wird durch die Summation der Beiträge der Wärmequellen in allen Tiefen erhalten:

$$T(\omega) = [1 - R(\lambda)] I_0 \beta T_d \int_0^\infty \frac{\exp[-(\beta + \sigma)z]}{4\kappa\sigma} dz \exp(j\omega t) \quad (28)$$

T_d ist der Wärmedurchgangskoeffizient, der den Übergang einer thermischen Welle durch die Oberfläche kennzeichnet. Für eine stark absorbierende Probe ($z = 0$; $\beta \gg \sigma$) ergibt sich eine punktuelle Wärmequelle an der Oberfläche der Probe. Gleichung (28) reduziert sich für $x = 0$ zu:

$$T(\omega) = \frac{[1 - R(\lambda)] I_0 T_d}{4\kappa\sigma} \left(\frac{\beta}{\beta + \sigma} \right) \exp(j\omega t) \quad (29)$$

Liegt der umgekehrte Fall vor ($\beta \ll \sigma$), ist das Material nahezu transparent, somit reduziert sich obige Gleichung zu:

$$T(\omega) = \frac{[1 - R(\lambda)] I_0 T_d \beta}{4j\rho c \omega} \exp(j\omega t) \quad (30)$$

Abhängig von der Eindringtiefe eines Laserstrahls in das Probenmaterial entstehen thermische Wellen entweder an der Oberfläche (wie bei Metallen), in tieferen Bereichen unter der Oberfläche (nicht-metallische Absorber) oder über weite Bereiche einer Probe entlang des Laserstrahls. Dabei nimmt in allen Fällen die Oberflächentemperatur $T(\omega)$ mit ansteigender Modulationsfrequenz ab und ist dem Absorptionskoeffizienten der Probe direkt proportional.

Neben den bereits beschriebenen Effekten treten außerdem Lichtstreuung und Interferenzbildung im bestrahlten Material auf. Zumeist ist der Einfluss dieser Größen auf die Amplitude und die Phase des photothermischen Messsignals gering und kann vernachlässigt werden.

Der Einfluss von Materialeigenschaften auf das PD Signal

In Abschnitt 2.1 wurde bereits dargelegt, dass das Messsignal der photothermischen Ablenkung durch den Temperatur- bzw. Brechungsindexgradienten in der Gasphase über der Probe erzeugt wird. Das Temperaturfeld im Gas wiederum wird durch die Temperaturverteilung in der Oberfläche der Probe bestimmt (Gleichung (11) und (12)). Grundsätzlich müssen die optischen und die thermischen Eigenschaften des Materials berücksichtigt werden, will man beschreiben, wo bzw. wie der photothermische Effekt in jeder einzelnen Probe entsteht. In „Photothermal Science and Techniques“ wird die Oberflächentemperatur unter Berücksichtigung aller Probenverhältnisse in komplexer Form wiedergegeben (Gleichung 3.19 Quelle [52]). Unter bestimmten Bedingungen kann diese komplexe Form jedoch vereinfacht werden. Grundsätzlich muss zwischen optisch opaken und transparenten Materialien unterschieden werden. Aus thermischer Betrachtungsweise wird zwischen thermisch dicken und thermisch dünnen Festkörpern nochmals differenziert. Zur Beschreibung werden die optische Absorptionslänge l_β , die thermische Diffusionslänge μ und die Probendicke L herangezogen (Abb. 6).

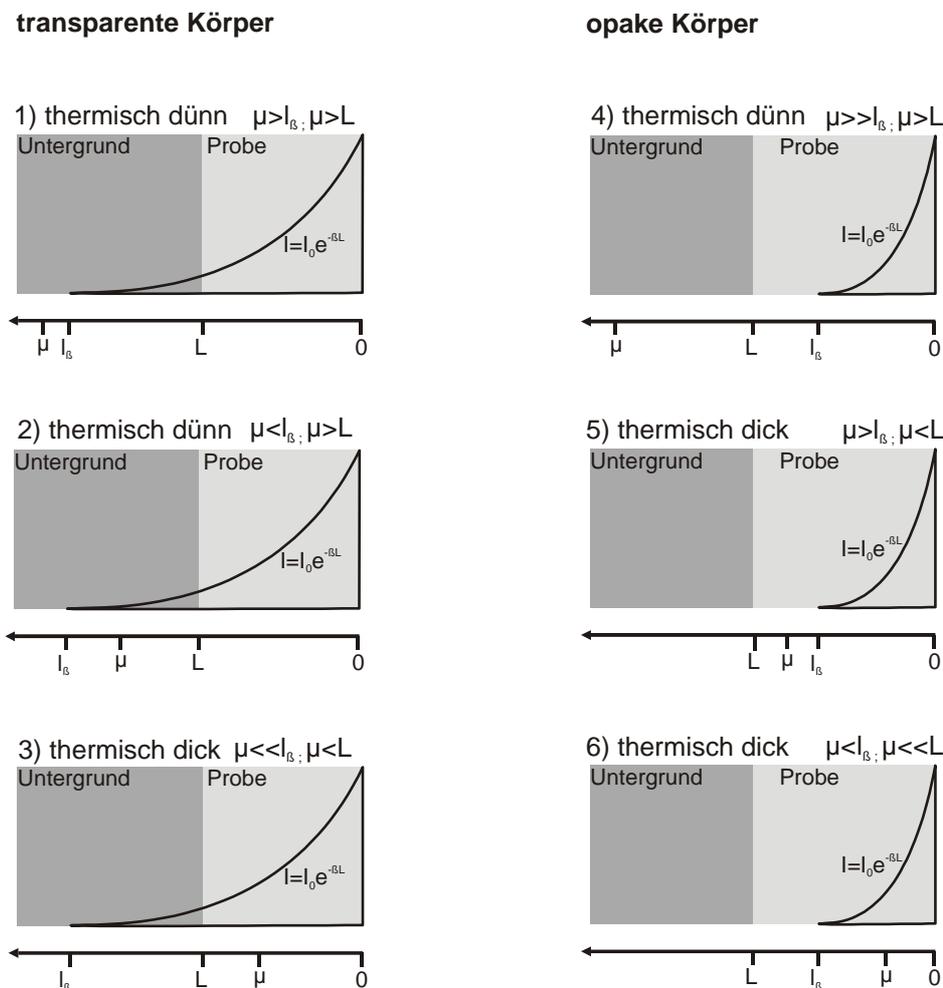


Abbildung 6: Das Schema veranschaulicht die Verhältnisse von optischer Absorptionslänge l_β , thermischer Diffusionslänge μ und Länge der Probe L für opake und transparente Festkörper mit variierenden thermischen Eigenschaften (thermisch dick und thermisch dünn). Ausführliche Erläuterungen befinden sich im Text.

Transparente Körper

Für transparente Körper gilt, dass die einfallende Strahlung über die gesamte Länge der Probe absorbiert wird, da $L < l_\beta$, und am anderen Ende den Körper wieder verlässt. Dabei ist die Intensität I der Strahlung:

$$I = I_0 e^{-\beta L} \quad (31)$$

Ist die thermische Diffusionslänge größer als die Dicke des Festkörpers $\mu > L$, erstreckt sich μ in die Unterlage der Probe und man spricht von einem **thermisch dünnen Festkörper** (Abb. 6 **Fall 1**). Die thermischen Eigenschaften der Unterlage bestimmen somit das PD Signal mit. Laut RG Theorie ergibt sich für das PD Signal:

$$S_{PD} \cong \frac{\beta L}{2a_g} \left(\frac{\mu_u}{\kappa_u} \right) K I_0 \quad (32)$$

Das Signal ist demnach dem Produkt aus der Dicke des Festkörpers L und dem Absorptionskoeffizienten β proportional. Außerdem werden mit dem Verhältnis von thermischer Diffusionslänge μ_u und Wärmeleitfähigkeit κ_u die Eigenschaften der Unterlage des Festkörpers berücksichtigt. Die Konstante K beinhaltet mehrere äußere Parameter, wie Druck und Temperatur. In **Fall 2** in Abbildung 6 ist $\mu < l_\beta$, gleichzeitig reicht die thermische Diffusionslänge aber noch über die Dicke des Körpers hinaus $\mu > L$, weshalb auch in diesem Fall Gleichung (32) gilt.

Im **Fall 3** ist $\mu \ll l_\beta$ und $\mu < L$, wodurch ein **thermisch dicker Körper** beschrieben wird. Für das Signal ergibt sich:

$$S_{PD} \cong \frac{\beta \mu_p}{2a_g} \left(\frac{\mu_p}{\kappa_p} \right) K I_0 \quad (33)$$

Allein die Strahlung, die im Probenkörper innerhalb einer Schicht, die der thermischen Diffusionslänge μ_p entspricht, absorbiert wird, trägt zum PD Signal bei, obwohl die Strahlung über die gesamte Dicke des Körpers absorbiert wird.

Opake Körper

Ist die optische Absorptionslänge klein im Vergleich zur Dicke des Probenkörpers $l_\beta < L$, spricht man von opakem Verhalten. Für den **thermisch dünnen Körper** (Abb. 6 **Fall 4**) gilt $\mu > L$ und in diesem Fall $\mu \gg l_\beta$. Für das PD Signal ergibt sich:

$$S_{PD} \cong \frac{1}{2a_g} \left(\frac{\mu_u}{\kappa_u} \right) K I_0 \quad (34)$$

Das Signal ist unabhängig von den thermischen und optischen Eigenschaften der Probe. Es wird dafür maßgeblich durch die Unterlage und die Intensität der Strahlungsquelle I_0 beeinflusst.

Fall 5 beschreibt den **thermisch dicken Körper**, wobei $\mu < L$ und $\mu > l_\beta$ ist.

$$S_{PD} \cong \frac{1}{2a_g} \left(\frac{\mu_p}{\kappa_p} \right) KI_0 \quad (35)$$

Im Gegensatz zum vorherigen Fall bestimmen hier die Eigenschaften der Probe das Messsignal. Wiederum starken Einfluss auf das PD Signal ist der Intensität der Strahlungsquelle zuzuschreiben. Der Absorptionskoeffizient hat keine Bedeutung.

Der **Fall 6** behandelt den **thermisch dicken Körper** mit sehr geringer thermischer Diffusionslänge $\mu \ll L$; $\mu < l_\beta$.

$$S_{PD} \cong \frac{\beta\mu_p}{2a_g} \left(\frac{\mu_p}{\kappa_p} \right) KI_0 \quad (36)$$

Obwohl dieser Körper optisch undurchlässig ist, hängt das PD Signal aufgrund des sehr geringen μ von dessen Absorptionskoeffizienten ab. Es trägt nur das innerhalb einer Strecke die μ entspricht unterhalb der Probenoberfläche absorbierte Licht zur Signalbildung bei (vergl. Fall 3).

2.1.3. Das elektronische photothermische Signal

Die Ablenkung des Detektionslasers (DTL) wird durch einen positionsempfindlichen Detektor (PSD = Position Sensitive Device) registriert, indem durch das Auftreffen des Lasers ein Photostrom mit der Spannung U in der Photodiode erzeugt wird. Diese Spannung kann für jeden Quadranten der 4Q Diode bzw. für jede Position der lateralen Diode ausgelesen werden. Variiert die Position des DTL auf der Diode, wird eine Spannungsänderung ΔU erzeugt, die proportional zur Ablenkung θ , des Lasers ist und als Amplitude des PD Signals bezeichnet wird. Da eine intensitätsmodulierte Anregungsquelle mit der Frequenz f verwendet wird, ändert sich die Temperaturverteilung der thermischen Linse zeitversetzt mit dieser Frequenz. Bei bekannter Frequenz kann dieser zeitliche Versatz als Phasenverschiebung Φ [°] zwischen der Anregungsfrequenz und der Spannungsänderung der Photodiode erfasst werden.

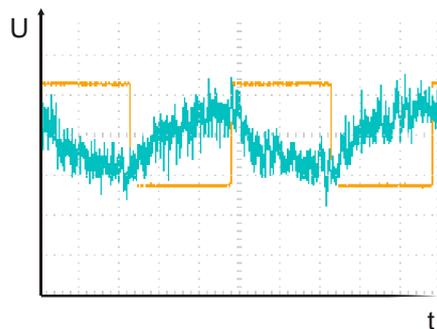


Abbildung 7:

Die Darstellung des PD Signals mittels Oszilloskop zeigt den Verlauf der Spannung U der Photodiode mit dem Rechtecksignal der Chopperfrequenz f .

Abbildung 7 zeigt den periodischen Verlauf der Spannung über die Zeit in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz (Rechtecksignal) an. Das PD Signal ist gegenüber der Chopperfrequenz um etwa 180° verschoben und der Verlauf ist kurvenartig, wodurch das beim sprunghaften Aufheizen bzw. Abkühlen träge thermische Verhalten der Probe deutlich wird. Amplitude und Phase des Signals beinhalten verschiedenartige Informationen über die Probe. Die Amplitude wird insbesondere vom Absorptionsverhalten des Untersuchungsmaterials beeinflusst, wodurch beispielsweise Rückschlüsse auf Absorptionskoeffizienten gezogen werden können. Die Phasenverschie-

bung hingegen beinhaltet die zeitliche Komponente der Wärmeausbreitung in der Probe, welche durch die thermische Diffusivität α bedingt wird.

2.1.4. Zusammenfassung PDS

- Nehmen normaler z_n oder transversaler Versatz y_t des Detektionslasers zu, nimmt die Amplitude des PD Signals ab.
- Mit zunehmender Frequenz f der Anregungsstrahlung nimmt die Amplitude des PD Signals ab.
- Das PD Signal ist in allen Fällen der eingestrahlten Lichtintensität I_0 proportional.
- Das PD Signal in transparenten Körpern ist dem Absorptionskoeffizienten des Untersuchungsmaterials β proportional.
- In transparente Systeme dringt die Anregungsstrahlung tief ein, so dass eine Probe auch unterhalb ihrer Oberfläche (z.B. hinsichtlich ihrer Konzentration) charakterisiert werden kann.
- Systeme mit sehr großem β lassen die Strahlung nur bis $1\ \mu\text{m}$ in die Probe eindringen, wodurch das PD Signal sehr stark vom oberflächennahen Bereich des Untersuchungsobjekts beeinflusst wird.
- Das PD Signal hängt in allen Fällen von der thermischen Diffusionslänge μ ab.
- Für die thermische Diffusionslänge μ ergibt sich nach Gleichung (23):

$$\mu = \sqrt{\frac{\alpha}{\pi f}} \quad (37)$$

- Damit ist μ über die Änderung der Modulationsfrequenz f der Anregungsstrahlung variabel, wodurch die Ermittlung von Tiefenprofilen möglich wird.
- Thermische Eigenschaften der Proben, wie die Wärmeleitfähigkeit κ oder die Temperaturleitfähigkeit α , können anhand der Gleichungen 31 bis 36 erhalten werden.

2.2. Grundlagen der Raman Mikroskopie

Im Jahr 1928 wurde von einem indischen Wissenschaftler eine neuartige Form der Strahlung gefunden, die später nach ihrem Entdecker als Raman Strahlung bezeichnet wurde [57]. Bis in die achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts fand die Raman Spektroskopie zwar als Messverfahren Einzug in die Naturwissenschaften, als Standardmethode in der chemischen Analytik wurde sie jedoch erst durch die Entwicklung der FT Raman Spektroskopie etabliert [58]. Bedingt durch Neuentwicklungen im Bereich der Detektionstechnologie (z. B. CCD = Charge Coupled Device), der Computertechnik und von neuen optischer Filtertypen sowie optischen Gittern kam es in den letzten 20 Jahren zu deutlichen Fortschritten bei der Technologie der dispersiven Raman Spektroskopie. Moderne Raman Spektrometer basieren heute auf der dispersiven Technik und zeigen eine verbesserte Sensitivität von mehreren Größenordnungen [59].

Bei der Raman Streuung ablaufende grundlegende Prozesse sind in Abbildung 8 dargestellt.

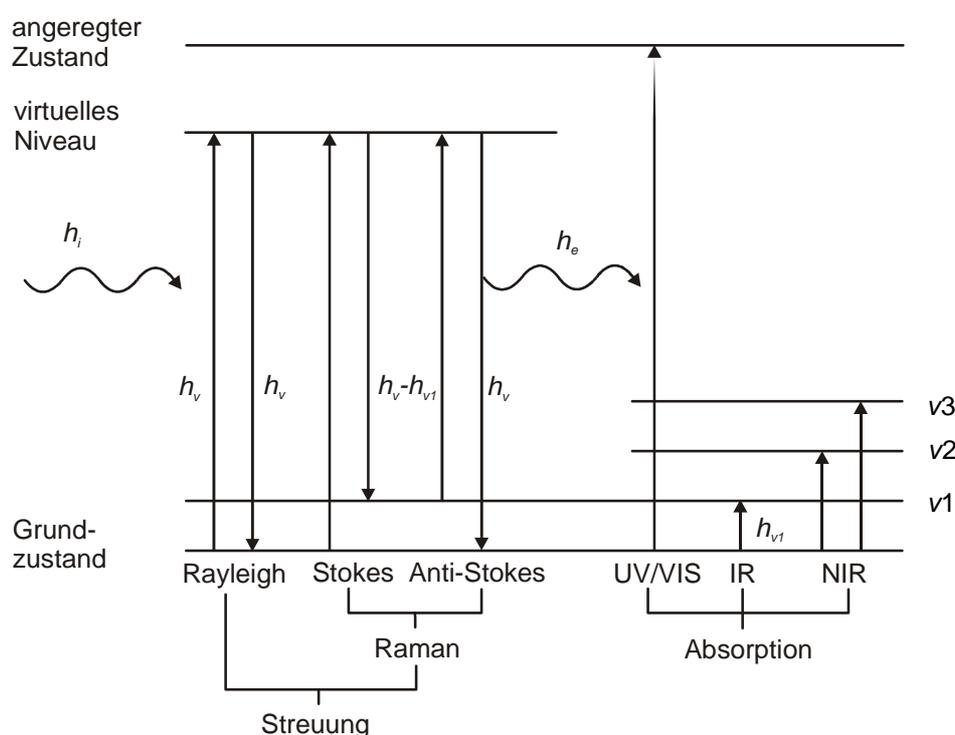


Abbildung 8: Energieschema für den Vorgang der Raman Streuung und verschiedener Absorptionsprozesse an einem Molekül. Dabei bezeichnet h_i die Energie des einfallenden und h_e die Energie des emittierten Lichtteilchens. h_v ist die Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem virtuellen Anregungszustand. h_{v1} muss überwunden werden, damit ein Molekül in den angeregten Zustand $v1$ erreicht. Grafik in Anlehnung an [60] (Abbildung 1.1)

Dabei kann es zur Interaktion eines Photons mit einem Molekül kommen, wodurch dieses in einen kurzlebigen virtuellen Anregungszustand gerät. Dieser Prozess kann im Sinne eines elastischen (Rayleigh Streuung) oder eines nicht-elastischen Stoßes (Raman Streuung) betrachtet werden. Denn wenn es zur Wechselwirkung des elektrischen Feldes der Lichtwelle mit der Schwingung eines Molekülteils kommt, kann wie bei einem nicht-elastischen Stoß ein Teil der Energie h_i bei der Kollision der Teilchen übertragen werden, so dass ein Lichtteilchen mit niedrigerer Frequenz (h_e) emittiert wird. In diesem Fall spricht man von der Stokes Streuung. Befindet sich ein Molekül bereits in einem höheren Anregungszustand, gibt es eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass Energie beim Verlassen des virtuellen Zustandes auf das eintreffende Photon übertragen wird, wodurch es zu einer Frequenzerhöhung (h_e) kommt, welche als Anti Stokes Streuung bezeichnet

wird. Der Frequenzverschiebung der emittierten Photonen können die an der Wechselwirkung beteiligten Molekülgruppen zugeordnet werden, so dass resultierend ein Spektrum erhalten wird, dass dem IR Spektrum komplementär ist.

Zur Anregung des Raman Effekts werden aufgrund der hohen Energiedichte sowie der Strahlqualität Laser als Quellen eingesetzt. Häufig verwendete Typen sind der Argon Ionen Laser ($\lambda = 514,5 \text{ nm}$ und $488,0 \text{ nm}$), der Nd:YAG Laser, dessen Wellenlänge 1064 nm bzw. 532 nm beträgt. Außerdem kommen He-Ne Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) und nahe dem NIR Bereich mit $\lambda = 785 \text{ nm}$ Diodenlaser zur Anwendung.

Anders als bei Reflexions- und Transmissionsmessungen wird gestreute Strahlung ungerichtet in alle Raumrichtungen emittiert, wodurch die Detektion ebenfalls von allen Seiten erfolgen kann. Somit sind auch opake oder nicht-reflektierende Materialien mittels Raman Spektroskopie der chemischen Analyse zugänglich. Außerdem wird die Koppelung von Raman Spektrometern mit Mikroskopen möglich, ohne dass in Transmission oder Reflexion gemessen werden muss. Diese Form wird auch als Raman Mikrospektroskopie bezeichnet. Sie erlaubt kontaktlose, örtlich hoch aufgelöste Messungen eines breiten Spektrums von Materialien ohne jegliche Probenvorbereitung. Hierzu wird der Laser über einen Strahlteiler in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt und durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Die gestreute Strahlung wird mittels des selben Objektivs gesammelt und zum Detektor geleitet. Zuvor erfolgt die Aufspaltung nach ihrer Frequenz anhand eines optischen Gitters. Zur Trennung von der Rayleigh Streustrahlung können ein Kantenfilter oder ein Notch- Filter eingesetzt werden, welche Licht der Wellenlänge des Anregungslasers blockieren. Neben der visuellen Charakterisierung kann somit die chemische Analyse eines definierten Punktes einer Probe erfolgen. Die laterale Auflösung eines Raman Mikroskops wird durch den Durchmesser des Laser-Spots auf der Probe begrenzt [60]:

$$d_L = f_w \cdot \varphi_d \quad (38)$$

Der Winkel φ_d beschreibt die Divergenz des Strahls und f_w ist die Brennweite der verwendeten Linse. Also werden für Objektive mit kurzer Brennweite deutlich bessere Werte für die laterale Auflösung möglich, dies bedeutet, dass auch die Energiedichte im Laserspot der Probe steigt. Da Laser sich bereits durch eine sehr niedrige Strahldivergenz auszeichnen und man von kollimierten Strahlungsquellen sprechen kann, ist φ_d in dieser Anordnung von geringerer Bedeutung für die Auflösung. Die Ausbreitung oder Länge des Laserfokus entlang der Strahlachse kann ebenfalls mittels φ_d und f_w abgeschätzt werden:

$$z_f = \sqrt{\frac{3\pi(f_w \cdot \varphi_d)^2}{\lambda}} \quad (39)$$

Auch hier gilt, je größer die Brennweite, desto größer ist auch die Ausdehnung des Fokus. Um eine möglichst hohe räumliche Auflösung zu erhalten, werden Objektive mit kurzer Brennweite verwendet. Außerdem kann eine exakt positionierte Lochblende im Strahlengang des Mikroskops die Tiefenauflösung deutlich verbessern, indem sie den Teil der Strahlung blockiert, welcher nicht aus der Fokus-Ebene z stammt (Abb. 9). Dieses einfache Prinzip kommt bei der konfokalen Mikroskopie zur Anwendung. Wird mittels eines beweglichen Tisches eine Probe in z -Richtung also im Fokus verschoben, kann ein Tiefenprofil des Materials erstellt werden, vorausgesetzt die Probe ist zumindest teilweise transparent.

Beim Übergang des Laserstrahls von der Gasphase (Luft) in die Probe kommt es aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes ($n_g < n_p$) zur Ablenkung der Strahlen, so dass die fokale Posi-

tion z_p in tiefere Bereiche der Probe verschoben wird. Des Weiteren kommt es zu einer stärkeren Ausdehnung der Länge des Fokus z_f , wodurch sich die Tiefenauflösung deutlich verschlechtert. Die Anwendung einer Immersionsflüssigkeit mit einem der Probe vergleichbarem Brechungsindex kann den Effekt der Brechung weitgehend aufheben. Von einem echten kontaktlosen Verfahren kann dann jedoch nicht mehr gesprochen werden, da es zu Interaktionen zwischen dem Material der Probe und der Immersionsflüssigkeit kommen kann. Eine Möglichkeit die Ablenkung der fokussierten Strahlen an der Grenzfläche Luft/Probe rechnerisch zu korrigieren, wird von Everall aufgezeigt [61]. Die tatsächliche Eindringtiefe der fokussierten Laserstrahlen z_u ist demnach über folgenden Zusammenhang von der eingestellten Eindringtiefe Δ abhängig:

$$z_u = \Delta \left[u^2 \frac{NA^2 (n_p^2 - 1)}{(1 - NA^2)} + n_p^2 \right]^{1/2} \quad (40)$$

Hier wird u als normierter Radius der Linse des Objektivs ($u = r/r_{max}$) definiert, der von einem Teil der Strahlen passiert wird. NA ist die numerische Apertur der Linse und n_p ist wieder der Brechungsindex der Probe. Für den Teil der Strahlung, welcher die Linse im Zentrum passiert, wird $u = 0$, somit verschiebt sich die Fokusebene z_u um den Faktor Δn_p . Für den Teil des Lichts, der die Linse im äußeren Bereich durchquert wird $u = 1$, worin die maximale Tiefe des Fokus erreicht wird. Anhand von Gleichung (40) erhält man einerseits die wahre Position der Fokusebene in der Probe, andererseits kann anhand der Berechnung von $z_{u=1} - z_{u=0}$ ebenso Ausdehnung des Fokus in der Probe bestimmt werden.

An dieser Stelle soll außerdem auf weitere Methoden zur Korrektur der Eindringtiefe hingewiesen werden, die in den letzten zehn Jahren u.a. von Everall und Tomba entwickelt [62-64] wurden.

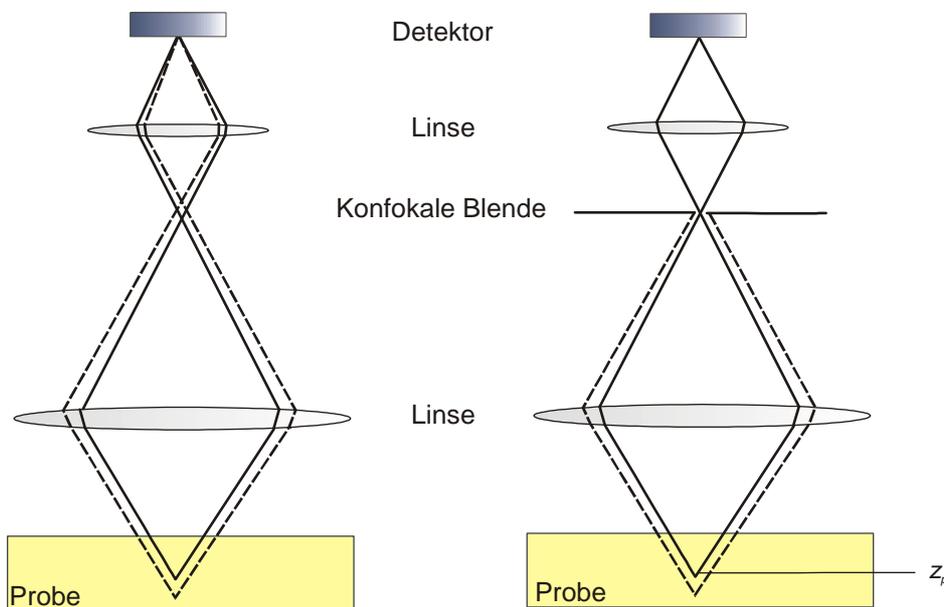


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung des Aufbaus der optischen Bauteile eines Mikroskops (links) und eines konfokalen Mikroskops (rechts). Die zusätzliche Lochblende blockiert den Teil der Strahlung, der nicht aus der Ebene des Fokus (z_p) stammt.

2.3. Stofftransport – Bestimmung des Diffusionskoeffizienten

Betrachtet man den Transport eines aus einer halbfesten Formulierung freigesetzten Wirkstoffs in einer Membran, sind verschiedene Prozesse zu berücksichtigen. Zunächst muss der Stoff zur Phasengrenze gelangen, wo in einem zweiten Schritt der Übertritt von einer Phase in die andere erfolgt und letztlich der eigentliche Wegtransport von der Phasengrenze in der Membran stattfindet. Treten diese Mechanismen in unbewegten Phasen mit einer stabilen Grenzfläche auf, sind die Transportvorgänge diffusionsgesteuert. Laut Ficks mathematischer Theorie der Diffusion, ist die Rate F an transportierter Substanz pro Fläche dem Konzentrationsgradienten $\partial c/\partial x$ proportional:

$$F = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (41)$$

In isotropen Medien oder verdünnten Lösungen kann der Diffusionskoeffizient D als konstant angenommen werden. Dagegen ist D in der Mehrzahl der Fälle abhängig von der Richtung der Diffusion oder der Konzentration c der diffundierenden Substanz. Stellt man nach D um und kürzt die Einheiten, wird ersichtlich, dass D nur durch das Verhältnis von Fläche zu Zeit [cm^2/s] charakterisiert wird. Ficks erstes Gesetz (Gleichung 41) gilt dabei nur für Medien, deren Diffusionseigenschaften in alle Raumrichtungen identisch sind:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad (42)$$

Wird dagegen nur eine Dimension betrachtet, erhält man folgenden Zusammenhang,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, \quad (43)$$

welcher als zweites Diffusionsgesetz beschrieben wird. Während das erste Diffusionsgesetz die Abhängigkeit des Massestromes F vom Konzentrationsgradienten im Fließgleichgewicht beschreibt, gilt das zweite Gesetz allgemein und betrifft die Änderung der Konzentration des diffundierenden Stoffes an jeder Stelle x [65].

Da komplette Lösungen der Diffusionsgesetze sehr komplex sind, werden Experimente zur Bestimmung von D meist so ausgelegt, dass vereinfachend nur eine Dimension betrachtet wird.

In Hinblick auf die Diffusion von Wirkstoffen in Membranen (Haut, Hautmodelle oder auch Primärverpackungen von Arzneimitteln) bietet die PDS als kontaktloses Messverfahren mit hoher Ortsauflösung die Möglichkeit der *in situ* Betrachtung solcher Prozesse. Wodurch Permeationsversuche mit zusätzlichen Akzeptormedien überflüssig werden. Ein zu betrachtendes System besteht nunmehr lediglich aus 2 Phasen, wobei die Formulierung die Donatorphase mit der Konzentration c_0 bildet. Die Membran fungiert als Akzeptorphase mit der Wirkstoffkonzentration c . Der Diffusionsweg sei x mit der Phasengrenze bei $x = 0$ und dem Akzeptor für Werte $x > 0$.

Nimmt man folgende Bedingungen für ein halbusendliches Akzeptormedium an,

$$\begin{array}{lll} c = 0 & x > 0 & t = 0, \\ c = c_0 & x = 0 & t > 0, \end{array}$$

kann anhand der Laplace-Transformation des Problems (Gleichung 43) die Lösung erhalten werden [66]:

$$c = c_0 \cdot \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (44)$$

Die zur Gausschen Fehlerfunktion komplementäre Funktion erfc stellt in der vorliegenden Form die beste Approximation zu beschriebenem Diffusionsvorgang dar. Wird für $x/\sqrt{D} = b$ eingesetzt, wobei $x = 1/l$, kann die Konzentrations-Zeit-Kurve anhand folgender Gleichung beschrieben werden:

$$c = c_0 \cdot \operatorname{erfc}\left(\frac{b}{2\sqrt{t}}\right) \quad (45)$$

Der Diffusionskoeffizient D kann somit aus $D = (b/l)^2$ abgeschätzt werden. Die Strecke des Diffusionsweges ist l .

Betrachtet man die Diffusion in einem Medium, das von zwei Flächen begrenzt wird, nämlich bei $x = 0$ und $x = l$, ergeben sich weitere Möglichkeiten, den Diffusionskoeffizienten zu ermitteln. Sind die Donatorkonzentration c_1 (bei $x = 0$) und die Konzentration c_2 am Punkt ($x = l$) sowie die Konzentration in der Membran c_0 ($0 < x < l$) zunächst konstant, existiert ein Zeitintervall, in dem sich Steady State Bedingungen in der Membran einstellen. Wenn des Weiteren gilt:

$$c_2 = 0, \quad c = 0, \quad t = 0,$$

dann erhält man für die gesamte Masse M_t einer diffundierenden Substanz, die zum Zeitpunkt die den Membranabschnitt passiert hat:

$$\frac{M_t}{sc_1} = \frac{Dt}{l^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_1^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp(-Dn^2\pi^2 t/l^2) \quad (46)$$

Wenn $t \rightarrow \infty$, gilt:

$$M_t = \frac{Dc_1}{l} \left(t - \frac{l^2}{6D} \right) \quad (47)$$

In der Auftragung M_t gegen t ergibt sich für eine Gerade durch den steilsten Kurventeil der Schnittpunkt mit der t - Achse, der von Crank als "time lag" definiert wird zu $t_{lag} = l^2/6D$. Sind jedoch t_{lag} sowie die Dicke l der Diffusionsschicht bereits bekannt, kann der Diffusionskoeffizient D bestimmt werden [66].

3. Experimenteller Teil

3.1. Experimenteller Aufbau der verwendeten Photothermischen Messsysteme

Die Entwicklung eines neuen photothermischen Messsystems, welches für die Untersuchungen biopharmazeutischer Fragestellungen an großen Proben optimiert ist, war ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Die praktischen Durchführungen zum Aufbau eines photothermischen Messsystems und dessen Anwendung fanden überwiegend am KIT (Karlsruhe Institute of Technology) im Institut für technische Chemie (ITC), dem späteren Institut für funktionelle Grenzflächen (IFG), in der Arbeitsgruppe Spektroskopie statt, da dort sowohl die Komponenten als auch die Sachkenntnis für den Aufbau eines entsprechenden photothermischen Messplatzes vorhanden waren. Zu Beginn der Arbeit konnte auf ein bestehendes Messgerät (Monobloc Einheit) zurückgegriffen werden. Im ersten Schritt wurde eine neue Steuer- und Auswertungssoftware erstellt. Im Zuge dessen sollte das Spektrum der Messoptionen, die sich zuvor auf PD Imaging beschränkten, auf Einpunktmessungen und die Möglichkeit zeit- und frequenz aufgelöst zu messen, erweitert werden. Nach der Anpassung des Monobloc Systems sollte dann die Konstruktion eines neuen Messgeräts auf Grundlage der erhaltenen Erfahrungen erfolgen. Das für den Messplatz speziell entwickelte Programm FK-TL (Festkörper-Thermische-Linse) sowie die Steuerung für den PD Scanner wurden in Zusammenarbeit mit der Firma mm- μ C-Systems in dieser Arbeit entwickelt.

3.1.1. Aufbau des photothermischen Messplatzes Monobloc Einheit

Das existierende Messsystem wurde, vor Beginn der Anwendung für pharmazeutische Fragestellungen, vornehmlich für die Untersuchung von Kupferpatina und historischen Buchtexten verwendet [67-70]. Im Rahmen der Arbeit sollte das bestehende System weiterentwickelt und für Messungen an empfindlichen Proben angepasst werden. Kerneinheit des vorhandenen Systems war die Detektionseinheit Monobloc, nach welcher der photothermische Messplatz im Folgenden als Monobloc Einheit benannt sein soll. Auf dem Foto des Messaufbaus (Abb. 10) sind die Komponenten für ein photothermisches Messgerät dargestellt.

Die zu untersuchende Probe wird auf der Verschiebeeinheit (f) gehalten und kann dann manuell in z- Richtung und mittels motorisierter Lineartische in x- und y- Richtung positioniert werden, so dass der Strahl des Anregungslasers (a) nach Passage des Fokussierungssystems (d) auf die Probe trifft und der Messlaser der Detektionseinheit (e) in einem geeigneten Abstand zur Oberfläche der Probe verläuft und schließlich auf den positionsempfindlichen Detektor (PSD), in diesem Fall eine 4-Quadranten Diode, trifft. Um in der Probe ein statisches Temperaturfeld zu erzeugen, wird der Anregungslaser (a) mittels eines mechanischen Choppers (c) moduliert. Zur Einstellung der Intensität der Anregungsstrahlung wurde ein optischer Abschwächer (c) verwendet. Die unter (b) zu sehenden Komponenten sind optional. Es handelt sich um zwei Justierspiegel, die das Einkoppeln des Laserstrahls in das Fokussiersystem erleichterten. Außerdem ist ein Strahlteiler zu sehen, der 5% der Energie auf ein Leistungsmessgerät lenkt, mit dessen Hilfe die Ausgangsleistung des Lasers kontrolliert werden kann.

Der Gesamte Versuchsaufbau lässt sich in 3 Bereiche unterteilen:

1. Anregungseinheit bestehend aus einem Laser der mit einem Chopper moduliert und über eine optische Bank auf die Probe fokussiert wird.
2. Detektionseinheit bestehend aus Detektionslaser, einer 4-Quadranten Photo-Diode und der Probenhalteraufnahme, welche in x-,y-,z-Richtung präzise verschiebbar ist.
3. Datenregistrierung bestehend aus Vorverstärker, Lock-In-Verstärker, Oszilloskop und einem PC zur automatisierten Messwertaufzeichnung.

Die Anregungseinheit setzt sich aus den in Abbildung 10 dargestellten Komponenten (a, b, c, und d) zusammen. In Abbildung 11 sind die Bestandteile der Einheit schematisch angeordnet. Sie besteht aus einer Strahlungsquelle, dem Anregungslaser (AL). Dessen Strahlintensität wird durch einen mechanischen Chopper (C) moduliert, in einer optischen Bank mittels 3 Linsen (L1-L3) zunächst aufgeweitet, anschließend parallelisiert und schließlich über einen Spiegel (M) auf die Probe fokussiert. Da das photothermische Signal der Intensität I der Strahlungsquelle direkt proportional ist, wurde die Ausgangsleistung des Lasers im Betrieb mittels eines Detektors (Thermopile) überprüft. Dazu wurde ein Strahlteiler (DS) im Strahlengang positioniert, welcher einen Teil des Lichts durchließ und einen kleinen konstanten Anteil auf das Detektorelement lenkte. Um einen exakt zentral geführten Strahlengang des Anregungslasers durch die optische Bank zu erreichen, wurden eine Lochblende (A1) zu Beginn sowie eine verstellbare Irisblende (A2) in der Mitte der optischen Bank verwendet. Die exakte Strahlführung ist notwendig, um die vom Laser ausgehende Intensitätsverteilung über den Strahldurchmesser bis auf die Probe zu erhalten. Dieses Gaußsche Profil ist insbesondere für die Temperaturleitfähigkeitsmessungen von hoher Bedeutung.

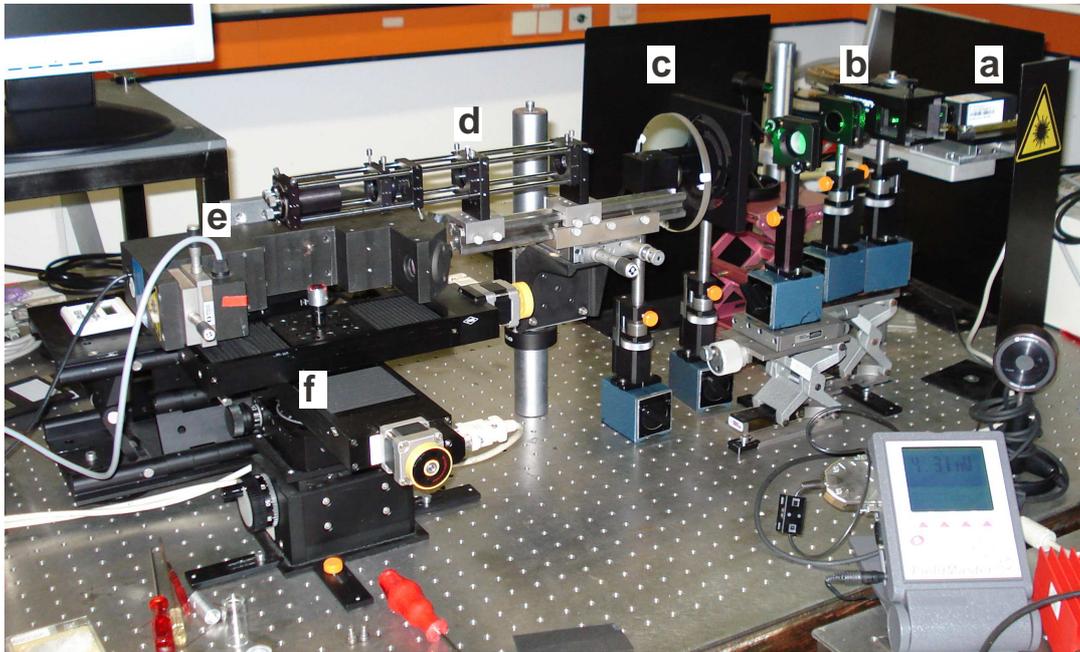


Abbildung 10: Foto des photothermischen Messplatzes mit der Detektionseinheit Monoblock (e).

- a) Nd:YAG Laser,
- b) Strahlteiler, Leistungsabnahme mittels Thermopile, Justierspiegel
- c) mechanischer Chopper, Abschwächer
- d) Fokussierungssystem mit Blende, Linsen und Spiegel
- e) Detektionseinheit Monoblock, mit HeNe Laser (Detektionslaser) und Vier-Quadranten-Diode (PSD)
- f) Probenhalter mit Verschiebeeinheit (x- und y Richtung automatisiert, z- Richtung manuell)

Anregungseinheit

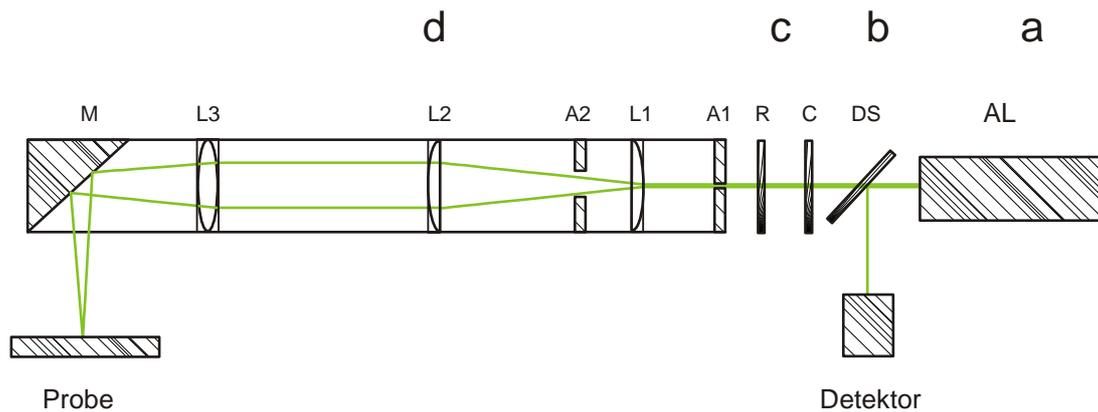


Abbildung 11: Detail - Querschnitt durch die Anregungseinheit mit den Bereichen a, b, c und d aus Abb. 10. Genaue Beschreibung befindet sich im Text.

Die Strahlengangführung wurde mit ausgebauten Linsen, der Lochblende und auf die auf das Minimum verschlossene Irisblende eingestellt. Dazu wurden die optische Bank und der Anregungslaser solange zueinander verdreht, bis der Anregungs-Laserstrahl Lochblende und Irisblende passierte. Desto größer der Abstand der beiden Blenden und umso kleiner deren Durchmesser ist, desto größer war die erreichte Genauigkeit der Strahlführung durch die optische Bank. Mit Hilfe der halb geöffneten Irisblende konnte während des Betriebes die korrekte Strahlengangführung ohne Ausbau der Linsen überprüft werden.

Die Untersuchung von Proben, die über sehr differenzierte thermische und optische Eigenschaften verfügen, bedingt eine gewisse Flexibilität insbesondere bei der Anregung der Proben. Ist die Intensität der Anregungsstrahlung zu gering, kann kein Signal erzeugt werden. Ist die Energie der Strahlung jedoch zu hoch, werden besonders organische Proben leicht zerstört. Somit wurde ein optischer Abschwächer (R) im Strahlengang positioniert, wodurch eine sehr dynamische Regelung der Laserleistung möglich wurde. Je nach Art der Probe konnte auf diese Weise die Leistung der Strahlungsquellen zwischen wenigen μW bis zu 200 mW eingestellt werden. Entscheidend für die in die Probe eingebrachte Energiemenge ist neben der Leistung des Lasers auch die Größe der Fläche des Laserpunktes auf der Probe. Dessen Durchmesser lässt sich bestimmen, wenn die Wellenlänge, Durchmesser des Laserstrahls und die Brennweite der Linse bekannt sind [71]. Bei Verwendung einer Linse mit einer Brennweite von $f_w = 200$ mm ergaben sich für die Durchmesser im Fokus für Nd:YAG (532 nm) $d_f = 135$ μm und für Nd:YAG (473 nm) $d_f = 86$ μm . Die resultierenden Flächen des Laserpunktes im Fokus waren $F_{Ls} = 0,0143$ mm^2 bzw. $0,0061$ mm^2 .

Die Modulation des Anregungslasers erfolgte über einen mechanischen Chopper (C), der zwischen optischer Bank und Laser positioniert wurde. Durch drei austauschbare Chopperblätter (2 Schlitz – 7/5 Schlitz und 60 Schlitz) konnten Frequenzen von 5 Hz bis 6000 Hz erzeugt werden. Durch die Modulation mit dem Chopper wird unabhängig von der Frequenz die cw-(continuous wave) Ausgangslaserleistung halbiert und in ein Rechtecksignal umgewandelt. Die Regelung des Choppers erfolgte frequenz – und phasengesteuert über die zugehörige Steuerbox. Das benötigte Steuersignal wird über eine Lichtschranke bereitgestellt, die im Chopper integriert ist und das Signal am äußeren Rand des Chopperrades abgreift. Dabei war die tatsächlich durch das Chopperrad erzeugte Phase des modulierten Anregungslasers in Abhängigkeit des gewählten Chopperrades und des Abstand zwischen Laserdurchtritt auf dem

Radius des Chopperblattes und der Lichtschranke um $\Delta\phi$ verschoben. Das an das Lock-In weitergeleitete Triggersignal beinhaltet diese zusätzliche Phasenverschiebung $\Delta\phi$ jedoch nicht. Einige Messungen sollten unabhängig vom Chopperradtyp und vom Chopperrad- durchgangsradius mitei-

inander verglichen werden. Dazu wurde ein Strahlteiler (BS) nach dem Chopperrad platziert und das auf dem Phototransistor ankommende Signal, welches unabhängig vom Chopperradtyp und Laserposition war, wurde als Trigger für den Lock-In verwendet.

Detektionseinheit mit Probenhalteraufnahme

Das Grundgerüst der Detektionseinheit bildet ein Aluminiumblock von hoher Steifigkeit (Abb. 12 (e)). Im so genannten Monobloc befinden sich der Detektionslaser (DTL), in diesem Fall ein He-Ne Laser ($\lambda=632,8$ nm) mit einer Leistung von 1 mW, zwei Spiegel zum Umlenken des Laserstrahls (M1 und M2) sowie eine Linse (L4). Mittels L4 wird der DTL auf die Position des Anregungslasers parallel zur Probenoberfläche fokussiert und trifft im weiteren Verlauf auf eine 4-Quadrantendiode (PSD = position sensitive device), mit der die Ablenkung des Detektionslasers gemessen wird. Alle Komponenten der Detektion sind somit in das sehr stabile Grundgerüst eingebunden, wodurch eine hohe Beständigkeit gegenüber äußeren Einflüssen gegeben ist. Die Linse, der Laser, die Spiegel und die PSD sind durch Stellschrauben justierbar. Die komplette Detektionseinheit kann in y- und z- Richtung mit Mikrometerschrauben positioniert werden. Die Beweglichkeit der Einheit in y- Richtung erlaubt Messungen, bei denen die Detektionseinheit relativ zum Anregungslaser verfahren werden kann, das sogenannte Zero Crossing (Kapitel 3.6). Der 4-Quadranten Diode ist ein Bandpassfilter vorgeschaltet, der nur Licht im Wellenlängenbereich des Detektionslasers ($\lambda=632,8$ nm) passieren lässt.

Die Probenhalteraufnahme (Abb. 12 f) besteht aus zwei senkrecht aufeinander montierten LINOS Schrittmotor-Lineartischen, die die Positionierung der Probe in x- und y-Richtung relativ zum Anregungsstahl ermöglichen. Diese erreichen eine maximale laterale Auflösung von je $1 \mu\text{m}$. Neben Einpunktmessungen an beliebigen Punkten können bei bewegter Probe und gleich bleibender Position von Anregung und Detektion automatisierte 2D und 3D Scans durchgeführt werden. Die beiden Schrittmotor-Lineartische sind auf einem um die z-Achse drehbaren Präzisions- Drehtisch montiert. Dadurch kann eine parallele Detektions-strahlführung zur Probenoberfläche unabhängig von der Probengeometrie gewährleistet werden. Der Drehtisch ist wiederum auf einem in z-Richtung verschiebbaren Lineartisch montiert, wodurch der Abstand zwischen Probenoberfläche und Detektionslaser eingestellt werden kann.

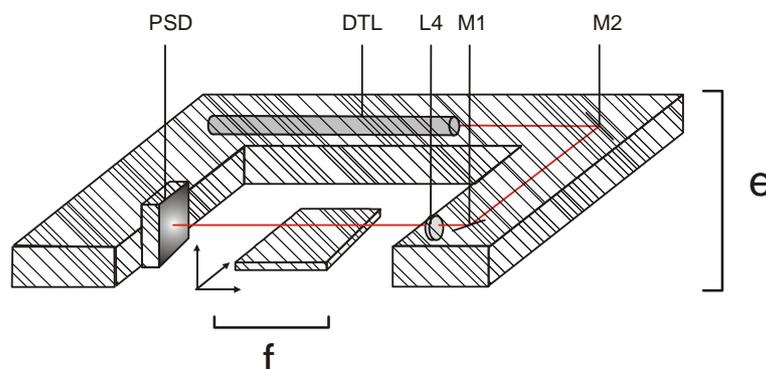


Abbildung 12:

Die Detektionseinheit Monobloc besteht aus einem Aluminiumblock (e), welcher den Detektionslaser (DTL), zwei Spiegel (M1 und M2) und eine bikonvexe Linse L4 beinhaltet. Die Ablenkung des Detektionslasers wird mit der positionsempfindlichen Diode (PSD) gemessen.

Steuerung und Datenaufnahme

Die Signalaufnahme und -registrierung (Abb. 13) beginnt mit der 4-Quadranten Photodiode QD. Es handelt sich um einen positionsempfindlichen Detektor, bei dem vier Siliziumdioden kreisförmig angeordnet sind. Die einfallenden Photonen des Detektionsstrahls erzeugen einen Photostrom. Durch Auswertung des Differenzsignals der vier bzw. von zwei Dioden ist eine Positionsbestimmung des auftreffenden Lasers möglich. Sind alle vier Dioden gleichmäßig ausgeleuchtet, ist das Differenzsignal folglich null. Die für die Ablenkung relevanten Spannungssignale der ausgelesenen Photodioden der 4-Quadranten Diode werden über einen 9V Batterie betriebenen Vorverstärker verstärkt. Die beiden vorverstärkten Signale werden dem Lock-In-Verstärker als Kanal A und B zugeführt und dort das zu verarbeitende Differenzsignal (A-B) gebildet. Als weiteren Signaleingang wird dem Lock-In-Verstärker zum Triggern des Signals (A-B) das Frequenzsignal des Choppers bereitgestellt. Zur Signaldarstellung und zur Justierung der nötigen Grundeinstellungen wurde ein Zweikanal-Oszilloskop verwendet. Die parallel vor dem Lock-In-Verstärker abgegriffenen Signale A und B können durch Invertieren einer der beiden Signaleingänge als Spannungen über der Zeit gleichzeitig dargestellt werden. Die Signalaufnahme der Verstärkerdaten sowie die Ansteuerung des Lock-In-Verstärkers, des Choppers und der x-,y- OWIS Schrittmotoren erfolgt über eine GPIB Schnittstelle am PC. Das für den Messplatz speziell entwickelte Programm FK-TL (Festkörper-Thermische-Linse) wurde in Zusammenarbeit mit der Firma mm- μ C-Systems in dieser Arbeit entwickelt und ist in Form eines Handbuches dokumentiert.

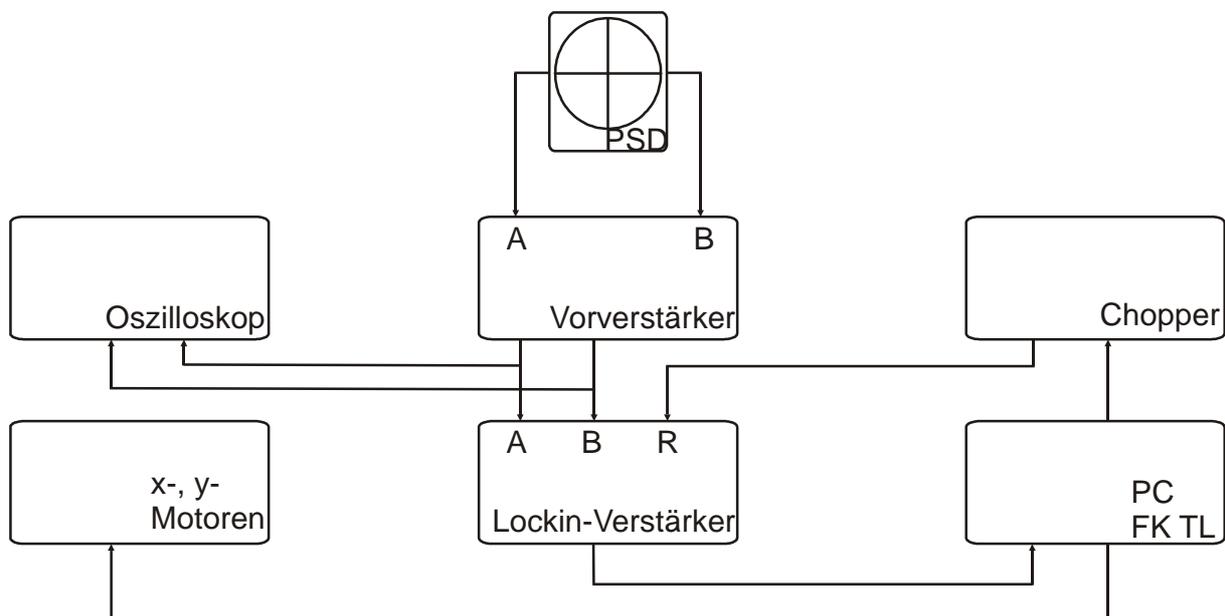


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Datenaufnahme für die Monobloc Einheit.

3.1.2. Entwicklung eines photothermischen Scannersystems

Um die Nachteile der Monobloc Einheit hinsichtlich der Größe und der statischen Messanordnung zu überwinden, sollte die Entwicklung eines photothermischen Messsystems, welches an die biopharmazeutische Fragestellungen dieser Arbeit angepasst sein sollte, ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit sein. Das neue Messgerät sollte sowohl Punktmessungen, als auch bildgebende Untersuchungen sowie Tiefenmessungen realisieren. Ebenso wurden hohe Anforderungen an die Kompaktheit des Systems gestellt. Als mögliche Option wurde ein photothermischer Sensor, der als Sonde auf Proben aufgesetzt werden kann [72], in Betracht gezogen.

Die Realisierung eines Sensors mit Imaging Modus wäre jedoch zu komplex gewesen, um sie im Rahmen dieser Arbeit umzusetzen. Als geeignete Variante eines solchen Messgeräts wurde ein PD Scanner als zweckdienlich erachtet. Da hier Anregungs- und Detektionslaser die Probe simultan abrastern, kann diese während der bildgebenden Messung unbewegt bleiben. Somit ist es möglich auch große Objekte photothermisch zu untersuchen. Außerdem sind ebenso Einpunkt- und Tiefenmessungen mit einem solchen Scann System durchführbar.

Eine große Herausforderung bei der Konstruktion eines PD Scanners ist die synchrone Strahlführung von Anregungs- und Detektionslaser. Um reproduzierbare Messergebnisse zu erzielen, muss der ohnehin sehr kleine Abstand zwischen den beiden Strahlen während der Messung und über den gesamten Messbereich konstant bleiben. Bei der Realisierung sind verschiedene Parameter, wie die Auflösung, Größe des Messbereichs, die Empfindlichkeit sowie die Kompaktheit des Systems und das Handling zu berücksichtigen.

Dem Aufbau eines Scanners können verschiedene Konzepte zugrunde liegen. Eine Variante beinhaltet die Laserstrahlführung über bewegliche Scannerspiegel, die die parallele Bewegung von Detektions- und Anregungsstrahl übernehmen. Als weitere Option können die Lichtwellen über optische Lichtleiter, deren Enden beweglich sind, positioniert werden.

Im Folgenden soll die Realisierung von zwei Optionen eines PD Messsystems beschrieben werden [73]. Die Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit der Firma mm- μ C-Systems.

3.1.2.1. Aufbau des Double Beam Laser Scanning Systems

Der Aufbau erfolgte zunächst als Weiterentwicklung nach dem Patent von Faubel und Heissler als Umsetzung für pharmazeutisch-biologische Fragestellungen [73]. Hier (Abb. 14) werden der DTL und der AL synchron über einen Scanner (SM1 und SM2) geleitet. Die Übereinanderlegung der Strahlen wird durch die Verwendung eines dichroitischen Spiegels (DM1), welcher die Anregungsstrahlung reflektiert und für den Detektionslaser durchlässig ist, realisiert.

Der Anregungsstrahl wird mittels eines mechanischen Choppers C, der direkt nach der Quelle positioniert ist, moduliert. Bevor der Strahl den Scanner passiert, erfolgt die Fokussierung des AL auf die Probenoberfläche mittels der bikonvexen Linse L1 mit langer Brennweite ($f = 200$ mm). Durch Ablenkung an DM1 erfolgt die Weiterleitung auf die Scannerspiegel SM1 und SM2. Die Scannerspiegel sind jeweils in y- Richtung (SM1) oder in x- Richtung (SM2) beweglich und können über die Software FK-TL Scan gesteuert werden. Der AL kann nach der Passage eines weiteren Strahlteiles (DM2) somit ein Messgebiet von 1×1 cm² abrastern. Da der DM1 für die Wellenlänge des Detektionslasers transparent ist, kann dieser vom DTL passiert werden. Somit durchlaufen beide Laser parallel die Scannerspiegel, wodurch sie eine synchrone Ablenkung erfahren. Im Folgenden wird der DTL mittels des zweiten dichroitischen Spiegels (DM2) diesmal umgelenkt und über die Spiegel M1 und M2 parallel zur Oberfläche der Probe auf den AL fokussiert (L2). Eine laterale Diode (PSD) misst die Ablenkung des Detektionslasers. Um sicherzustellen, dass keinerlei äußere Störstrahlung auf die Photodiode trifft, ist dieser ein Bandpassfilter, welcher nur für Strahlung einer Wellenlänge von 632,8 nm durchlässig ist, vorangestellt.

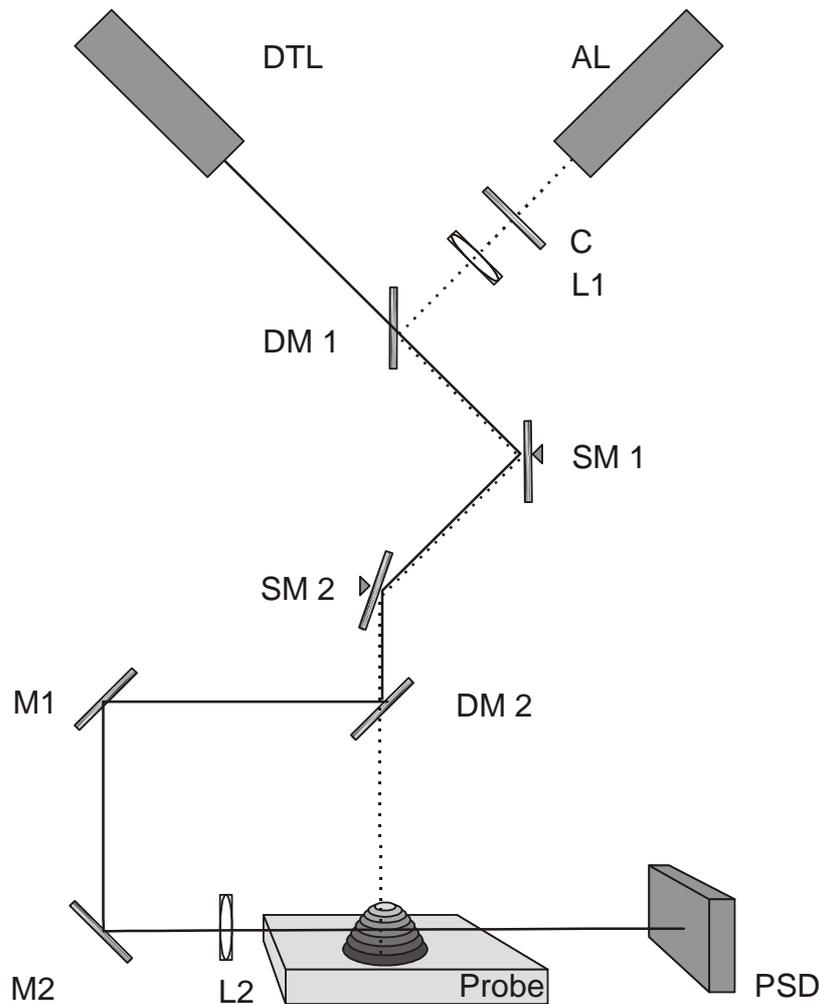


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Double Beam Laser Scanning System nach [73, 74].

3.1.2.2. Aufbau des Laser Scanning System

Das PD Signal des Double Beam Laser Scanning System zeigte bei den ersten Messungen ein hohes Rauschen. Als Ursache wurde eine Vibration der Galvanoscanner ausgemacht. Es handelt sich zwar um eine äußerst schwaches Vibrieren der Spiegel, welches jedoch durch den langen Weg, den der DTL nach Passage der Scannerspiegel zurücklegt, verstärkt wird. Um die Wegstrecke des DTL zu verkürzen, wurde der Aufbau so verändert, dass der Weg des DTL nicht mehr über die Scannerspiegel führte. Alternativ wurden der DTL und PSD in einer fixierten Anordnung arrangiert und bildeten als Detektionseinheit (DE) ein stabiles System (Abb. 15), welches in Hinblick auf die Funktionsweise mit der Monobloc Einheit vergleichbar war. Durch eine leichtere Bauweise und die Zuführung des DTL über eine optische Faser konnte das Gewicht reduziert werden, so dass die Positionierung über einen Schrittmotor möglich war. Der Strahl des Anregungslasers wird zunächst mit dem Chopper (C) moduliert und anschließend auf die Probenoberfläche durch eine Linse (L1) mit einer Brennweite von $f = 200$ mm fokussiert. Der Strahl des AL verläuft im Weiteren wie beim Double Beam Laser Scanning System (Kapitel: 3.1.2.1) über die Scannerspiegel SM1 und SM2, wodurch die Auslenkung in x- und y- Richtung und somit das Abrastern der Probenoberfläche ermöglicht wird. Der Detektionslaser hingegen wird über eine optische Faser (OF) zur Detektionseinheit übertragen, wo am Ende der Faser die Auskoppelung

und anschließend die Fokussierung parallel zur Probenoberfläche auf den AL erfolgen. Eine laterale Diode (PSD) misst die Ablenkung des Detektionslasers. Um sicherzustellen, dass keinerlei äußere Störstrahlung auf die Photodiode trifft, ist dieser wieder ein Bandpassfilter, welcher nur für Strahlung einer Wellenlänge von 632,8 nm durchlässig ist, vorangestellt.

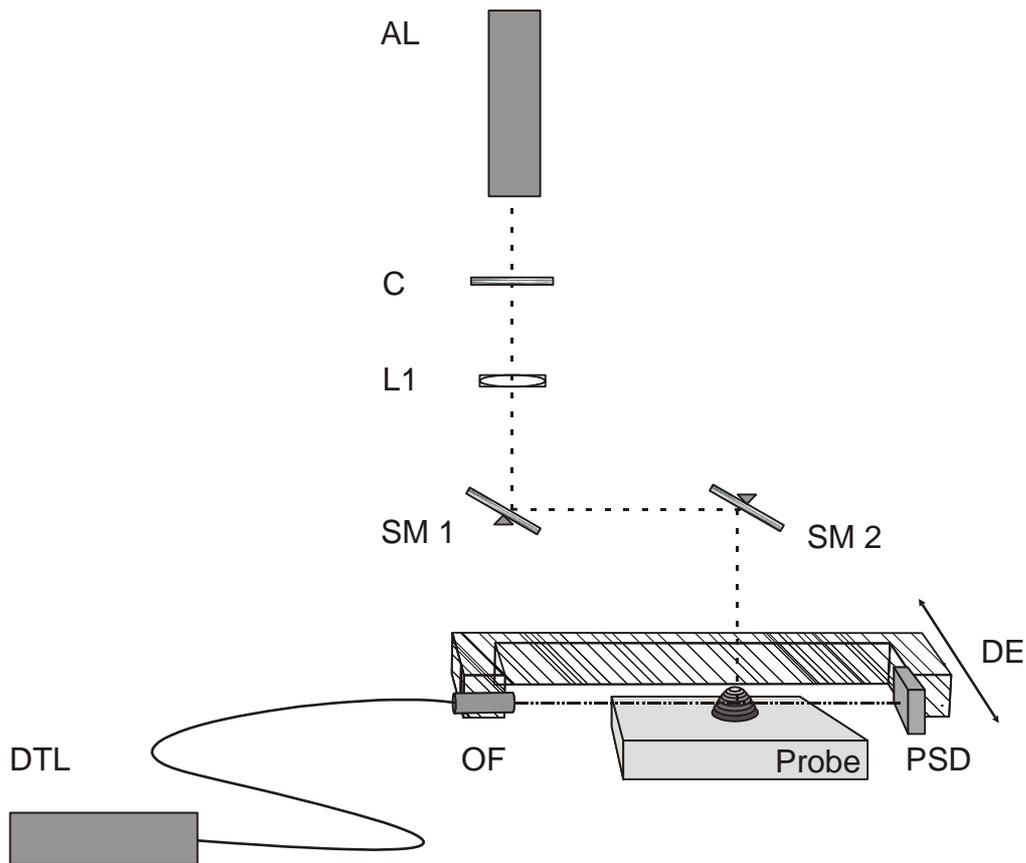


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Laser Scanning System.

3.1.3. Steuerung und Datenverarbeitung

Zur Datenaufnahme und für die Steuerung des Scanners wurde eine Steuerbox entwickelt, welche über eine USB Schnittstelle mit dem PC verbunden ist. Zum Betrieb der Monobloc Einheit sind verschiedene z. T. große Geräte zur Steuerung der Lineartische und zur Datenaufnahme (Vorverstärker und Lock-In Verstärker) nötig. Die Steuerbox bildet hingegen die zentrale Schnittstelle des Messplatzes, indem alle Bauteile über diese Box angesprochen werden (Abb. 16 a und b).

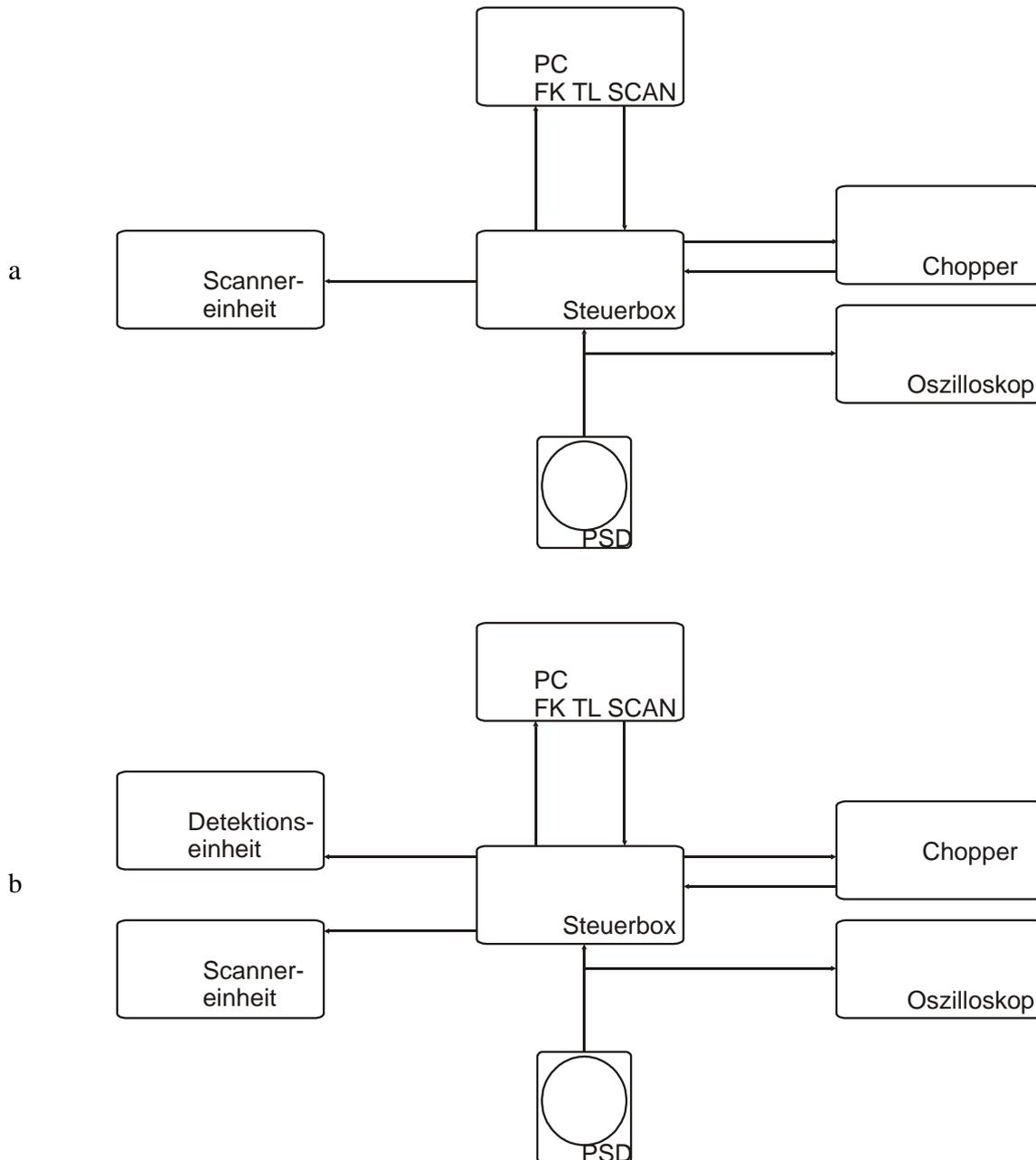


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Ansteuerung und der Datenaufnahme für a) Double Beam Laser Scanning System und b) das Single Beam Laser Scanning System.

Ein sehr kompakter Aufbau ist somit möglich. Im Unterschied zur Monobloc Einheit wird für die Scanner Systeme eine laterale Photodiode als PSD verwendet. Eine laterale Diode ist ein Detektor, der einen Lichtpunkt, der auf die Photoschicht trifft, ortsauflösend bestimmt. Während die 4-Quadranten Diode nur dann ein Signal liefert, wenn alle vier Quadranten auch vom Lichtfleck getroffen werden, wird die Positionsinformation einer PSD über die gesamte Fläche geliefert. Zur Erfassung des Ablenkungssignals ist der PSD direkt mit der Steuerbox verbunden. Das Referenzsignal erhält diese vom mechanischen Chopper, der über die PC Software eingestellt wird. Die Steuerbox verstärkt das mit der Chopperfrequenz getriggerte Signal, bevor es an den PC übertragen wird. Damit übernimmt die Steuerbox die Funktion eines Lock-In Verstärkers. Jedoch können lediglich Frequenzen bis 100 Hz verarbeitet werden. Wohingegen ein Lock-In Verstärker Signale im kHz Bereich umsetzen kann. Trotzdem ist damit die Kapazität der Steuerbox ausreichend, denn aufgrund der niedrigen Temperaturleitfähigkeit von organischen Materialien, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ist das PD Signal bei hohen Frequenzen sehr niedrig, weshalb Untersuchungen in der Regel mit Modulationsfrequenzen $f < 100 \text{ Hz}$ durchgeführt werden. Zur Darstellung des Signals und zur Justierung der Laser kann ein Zweikanal Oszilloskop das PD Signal vor der Steuerbox abgreifen.

Die Ansteuerung der Scannerspiegel wird ebenfalls von der Steuerbox übernommen, welche ihrerseits die eingegebenen Daten zum Messbereich vom PC bezieht. Als zusätzliche Komponente involviert die Steuerbox den Detektionsarm und sorgt für die synchrone Bewegung des DTL und des AL beim Single Beam Laser Scanning System.

3.1.4. Software

Die Steuerung des Photothermischen Messsystems Monobloc Einheit durch den Anwender erfolgt am PC mittels der während der Doktorarbeit erstellten Software FK-TL (Festkörper-Thermische Linse). Die Version für die PD Scannersysteme heißt FK-TL-Scan. Beide Versionen lassen sich über ein fast identisches Dialogfeld bedienen (Abb. 17). Unterschiede existieren lediglich bei den Grundeinstellungen sowie den Geräteparametern. Die Software FK-TL erlaubt hier Anpassungen für den Lock-In Verstärker und die Schrittmotoren der Monobloc Einheit. Die Scannerspiegel sowie die Detektionseinheit sind unter FK-TL-Scan einstellbar.

Die Taskleiste am oberen Rand der Softwareoberfläche beinhaltet die Felder „Datei“, „Modus“ und „Info“. Unter „Datei“ können Messungen und Messkonfigurationen neu eingerichtet geladen oder gespeichert werden. Als „Modus“ der Messung sind Einpunkt- oder Imaginguntersuchungen bzw. das Zero Crossing wählbar.

Im unteren Drittel des Fensters befindet sich der Bereich, in dem alle Einstellungen zur aktuellen Messung vorgenommen werden können. Unter dem Feld „Allgemein“ erfolgt die Dokumentation von Bearbeiter, Titel der Messung sowie dem Datum und der Zeit. Eine Möglichkeit zur exakten Beschreibung des Experiments bietet das Fenster „Kommentar“. Alle Einstellungen, die den Chopper, den Lock-In Verstärker und die Schrittmotoren bzw. die Scannerspiegel und die Detektionseinheit betreffen können unter „Grundeinstellungen“ und „Geräteparameter“ vorgenommen werden. Das Feld „Probenparameter“ erlaubt das Messgebiet auf der Probe exakt zu definieren. Außerdem gibt es die Möglichkeit automatische Wiederholmessungen durchzuführen, um Untersuchungen zeitlich aufgelöst durchzuführen. Ebenso kann die Chopper Frequenz und damit die Modulationsfrequenz der Anregungsstrahlung während der Messung variiert werden. Die exakte Navigation des Messpunktes auf der Probe erfolgt unter „Position anfahren“, indem der Laserspot des Anregungsstrahls durch Bewegung der Probe (Monobloc Einheit) oder durch die Bewegung der Laser (Scanner) auf der zu untersuchenden Oberfläche positioniert wird. Das Starten, die Verfolgung des Fortschritts eines Messdurchlaufs sowie dessen Beendigung ist unter dem Feld „Start/Stopp“ möglich. Zur besseren Veranschaulichung der Messergebnisse sind Anzeigeparameter unter „Darstellung“ variierbar.

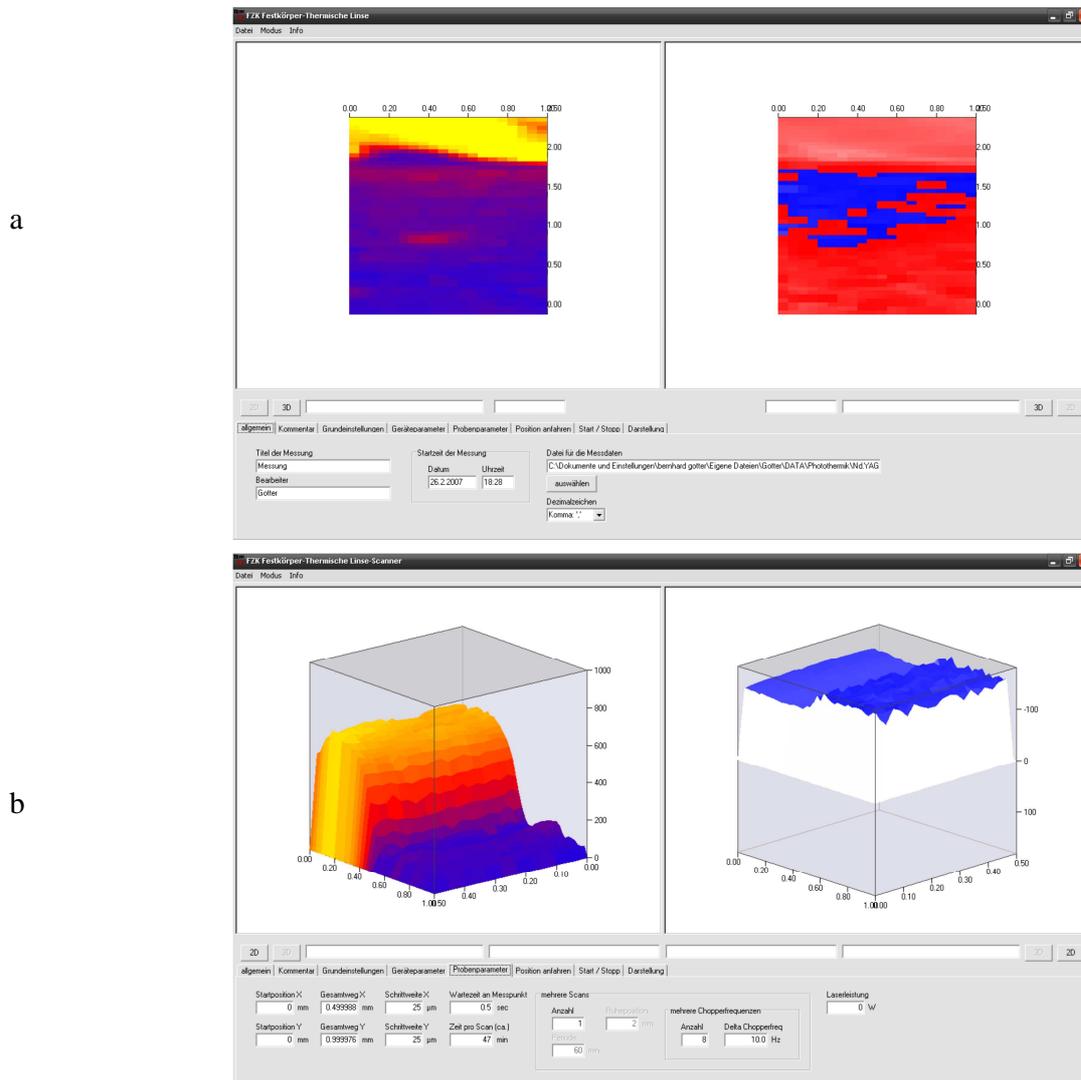


Abbildung 17: Dialog der Mess- und Steuersoftware a) FK-TL für die Monobloc Einheit und b) FK-TL Scan für den PD Scanner.

Zwischen der oberen Taskleiste und dem Einstellungsbereich befinden sich zwei Fenster, die der Ergebnisdarstellung dienen. Bei Flächenmessungen befinden sich auf der x- und y-Achse des dargestellten Graphen die Maße des Messbereichs, die z- Achse stellt im linken Fenster die Amplitude des Ablenkungssignals [μV] dar, während das rechte Fenster die Phase des Ablenkungssignals [Grad] zeigt. Die Amplitude bzw. Phase des PD Signals können sowohl als 2D Farbbild (Abb. 17 a), als auch in Form eines 3D Gitternetzes (Abb. 17 b) dargestellt werden. Bei der Durchführung von Einpunktmessungen oder Zero Crossing wechselt die Oberfläche zu einer Darstellungsweise mit nur einem Fenster (Anhang). Wird die Punktmessung als zeitlich aufgelöste Wiederholungsmessung durchgeführt, kann die Darstellung aller Messdaten wiederum in zwei Fenstern erfolgen. In diesem Fall ist die 3D oder 2D Darstellung wieder möglich, da hier die y- Achse zur Zeitachse wird.

3.1.5. Messoptionen

Zu Beginn der Arbeit bestand nur die Option, einfache Flächenmessungen mit der Monobloc Einheit durchzuführen. Mit der Entwicklung der neuen FK-TL Software wurde nicht nur die Anwenderoberfläche verbessert, sondern es wurden auch neuartige Messoptionen geschaffen (Abb. 18 – 20), die sowohl für die Monobloc Einheit, als auch für die Scannersysteme zur Verfügung stehen. Anhand dieses neuen, variablen Messsystems kann eine nahezu umfassende photothermische Charakterisierung von Proben und Prozessen vorgenommen werden.

PD Imaging / Flächenmessung

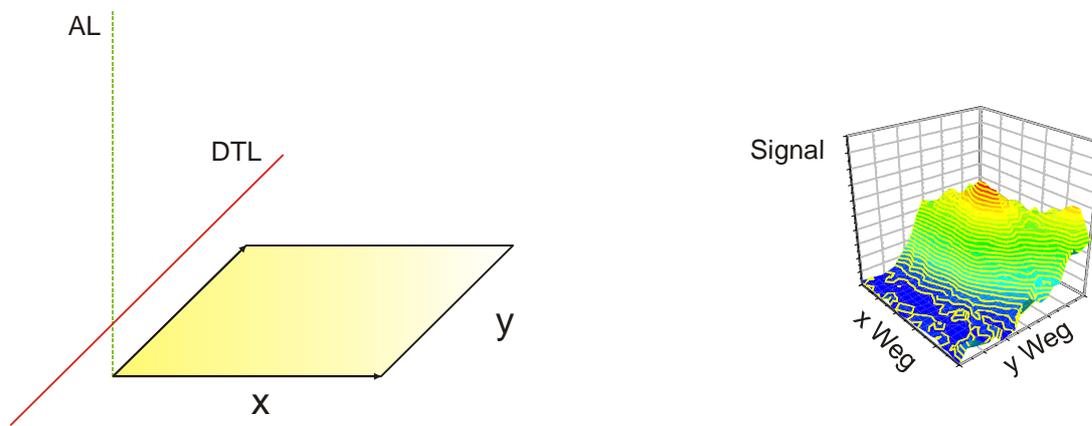


Abbildung 18:

Bei der Flächenmessung bzw. dem Imaging werden der Anregungslaser AL und der Detektionslaser DTL in zueinander konstanter Konstellation über die Probe bewegt (Scannersysteme) bzw. wird die Probe schrittweise unter der Laseranordnung positioniert (Monobloc Einheit). An jeder Position wird die Amplitude sowie die Phase des PD Signals gemessen. Anschließend wird jeder Koordinate das entsprechende Signal zugeordnet, so dass das Ergebnis im 2D oder 3D Modus angezeigt werden. Es gibt die Möglichkeit, automatisierte Wiederholmessungen im Abstand Δt bei konstanter und bei variabler Frequenz durchzuführen. Dieses bildgebende Messverfahren kann zur Untersuchung von oberflächennahen Bereichen in Hinblick auf laterale Unterschiede der thermischen und optischen Eigenschaften verwendet werden. Letzteres ist zum Beispiel beim Wirkstofftransport in Membranen der Fall.

PD Punktmessung

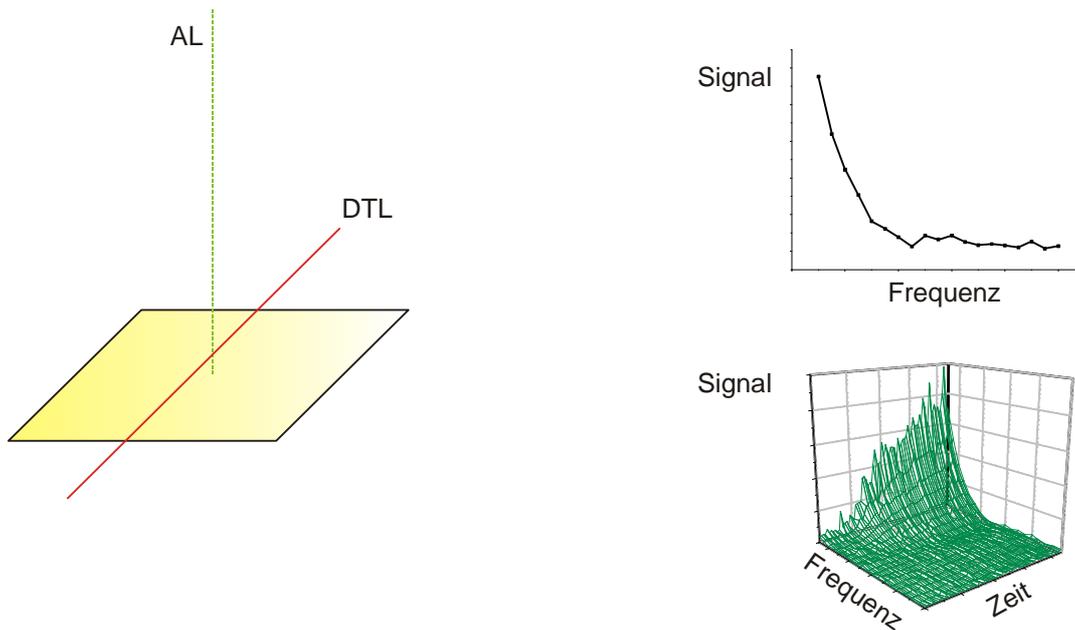


Abbildung 19:

Die Punktmessung wird an einer Position der Probe durchgeführt, dabei bleiben Anregungs- und Detektionslaser konstant positioniert. Die Amplitude und die Phase des PD Signals werden in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz der Anregungsstrahlung aufgezeichnet. Um die Kinetik von Prozessen erfassen zu können, ist es möglich die Punktmessung als Wiederholungsmessung mit dem Zeitintervall Δt durchzuführen. Diese Messvariante ermöglicht die tiefenaufgelöste und temporale Betrachtung von Prozessen wie z.B. der Wirkstoffpenetration in Membranen.

PD Zero Crossing

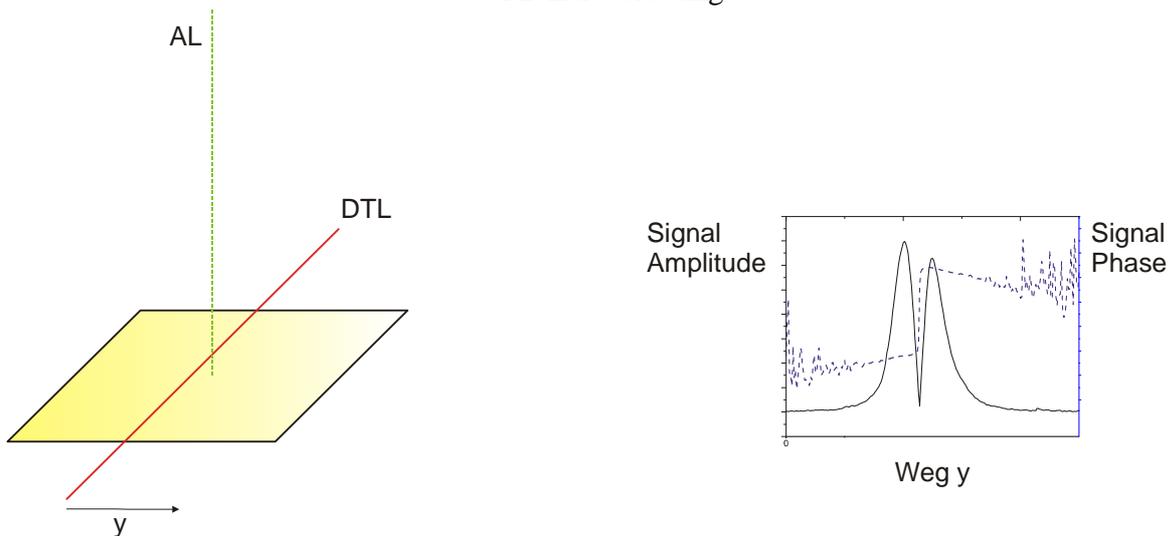


Abbildung 20:

Während des Zero Crossing bleibt der Anregungslaser an einer Position der Probe stehen. Der Detektionslaser wird schrittweise entlang der y - Achse durch den Bereich der thermischen Linse bewegt. An jeder Position des DTL werden Amplitude und Phase des PD Signals registriert und in Abhängigkeit zur Position dargestellt. Das Zero Crossing wird verwendet, um die Temperaturleitfähigkeit α des Untersuchungsmaterials zu bestimmen.

3.2. Membranen

Die Verwendung von Haut, humaner oder auch tierischer Herkunft, als Diffusionsbarriere für In-vitro-Versuche hat den Nachteil, dass dieses biologische Material natürlichen Schwankungen unterliegt, welche zu schlechten statistischen Ergebnissen führen. Hinzu kommen Schwierigkeiten bei der Lagerung sowie bei der Beschaffung aufgrund des begrenzten Kontingents zur Verfügung stehender Haut. Die Entwicklung von In-vitro-Modellsystemen mit künstlichen Akzeptormembranen bestehend u. a. aus Glycerol, Cellophan, Isopropylmyristat oder Silikon [75-79], bot eine Möglichkeit diese Nachteile zu umgehen. Diese Modellmembranen imitieren einzelne Charakteristika humaner Haut und erlauben *in vitro* eine Vorhersage über die Freisetzung, Penetration und Permeation von Substanzen *in vivo* [80-84]. Die In-vitro-Versuche an Modellmembranen wurden in der zugrunde liegenden Arbeit u.a. an DDC Membranen vorgenommen. Welche die lipophilen Eigenschaften des SC simulieren sollen. Eine standardisierte Herstellungsmethode ermöglichte, die Eigenschaften nahezu konstant zu halten. Durch den Vergleich der Wirkstoffpenetration unter Variation verschiedener Parameter ist es möglich die Einflüsse der verschiedenen Faktoren auf den Freisetzungs- und Penetrationsprozess zu charakterisieren. Trotz gewisser Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* Experimenten ist eine Korrelation der Ergebnisse möglich [85-87]. Als weiteres Modellsystem wurden Membranen aus Rinderhuf verwendet. Das Hufmaterial besteht wie das Stratum corneum oder humanes Nagelmaterial aus vollständig keratinisierten abgestorbenen Zellen [88]. Neben der Haut als Applikationsort für topische Zubereitungen stehen auch die Nagelflächen für die Arzneistoffanwendung zur Verfügung. Insbesondere in Form von wirkstoffhaltigen Lacken oder Cremes zur Behandlung von Nagelmykosen. Da humane Nägel jedoch äußerst schwierig zu beziehen sind und sich aufgrund ihrer Form und Größe schlecht bearbeiten lassen, können Membranen aus Rinderhuf wegen ihres ähnlichen Aufbaus als Modellmembranen verwendet werden [89]. Die verhärtete Proteinmatrix der Nagelplatte und auch des Rinderhufs besitzen jedoch im Vergleich zum SC einen eher hydrophilen Charakter [90]. Sie verhalten sich bei Kontakt mit Wasser wie hydrophile Gelmembranen. Vollständig hydratisiert, liegt der Wassergehalt im Rinderhuf bei 40 % m/m [88]. Die Keratinmembran aus Rinderhuf stellt ein hydrophiles Akzeptorsystem dar und ist somit eine Ergänzung zur lipophilen DDC Membran.

Sowohl Dodecanol/Collodium, als auch Keratin, sind im sichtbaren Spektralbereich weitgehend transparent. Diese Materialien können mit Laserquellen vom sichtbaren bis in den nahen infraroten Bereich bestrahlt werden, wobei durch die geringe Absorption nur sehr kleine PD Signale erzeugt werden. Ein Wirkstoff, der die Anregungsstrahlung absorbiert und in die Membran diffundiert, sollte ein messbares PD Signal erzeugen, welches sich vom Untergrundsignal abhebt.

3.2.1. Herstellung der DDC Membranen

Als einfaches Modellsystem für das Stratum corneum wurde von Fürst und Neubert eine lipophile Membran entwickelt [81]. Eine Collodium-Matrix bildet das Gerüst, in das das Lipid Dodecanol eingebettet ist.

Die Präparation der Membranen verlief nach folgender Rezeptur:

Dodecanol	4,0 g
Ether/Ethanol (8,5 : 1,5 v/v)	ad 100,0 g
Colodiumlösung 4% / 2%	ad 200,0 g

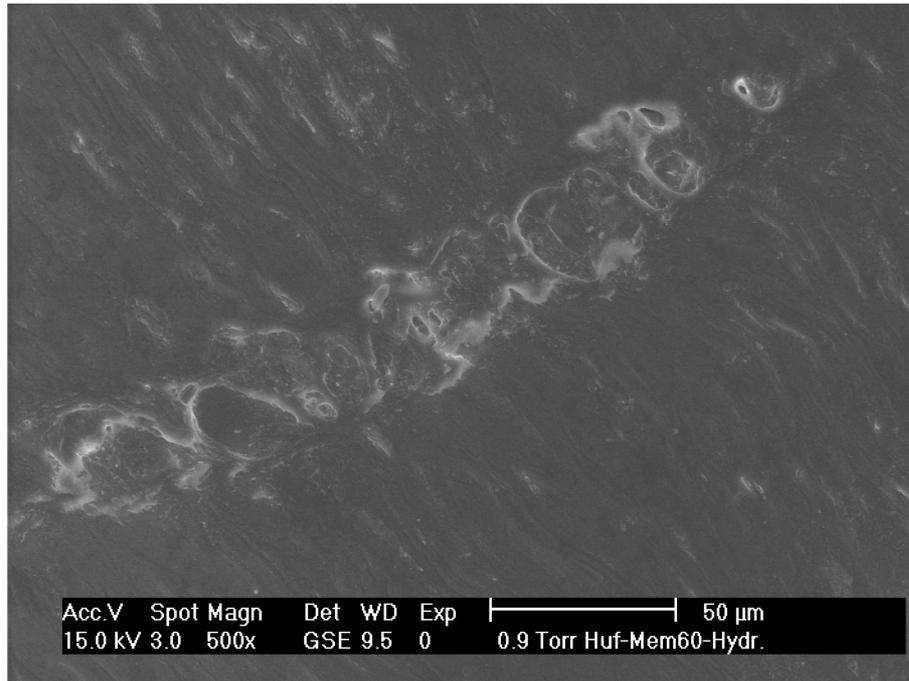
Die Herstellung wurde nach der Methode von Neubert und Fürst durchgeführt. Dodecanol wurde in der Ether/Ethanol Mischung gelöst und in der Collodiumlösung dispergiert. Die entstandene Mischung wurde auf ein Folienziehgerät (Eigenbau, Werkstatt MLU) gegeben. Nachdem das

Lösungsmittel vollständig abgedampft war, wurde die Membran abgelöst und in kleine Stücke geschnitten. Zur Herstellung individueller Membrandicken wurde die Mischung in variablem Volumen in Glasringen auf einer Teflonplatte ausgegossen. Die Kontaktfläche wurde zur Abdichtung mit Silikonfett beschichtet. Die Herstellung wirkstoffhaltiger Membranen erfolgte durch die Verwendung von Dodecanol Collodium Stammlösungen, die auf eine bestimmte Arzneistoffkonzentration eingestellt wurden. Durch das Abdampfen des Lösungsmittels blieb die wirkstoffhaltige Membran übrig. Nach dem Ablösen der Membranen wurde die Dicke unter Verwendung eines Schichtdickenmessgeräts bestimmt. Mittels eines Abbe Refraktometers wurde der Brechungsindex der DDC Membran bestimmt ($n_D^{20} = 1,465 \pm 0,025$).

3.2.2. Präparation von Rinderhufmembranen

Rinderhufe wurden von frisch geschlachteten Rindern bezogen und zunächst bei -32°C gefroren. Nachdem das komplette Material durchgefroren war (mind. 48 h) und sich alle Bestandteile im festen Aggregatzustand befanden, wurden mit einer Metallsäge Stücke von 2 - 4 cm^2 entnommen. Sowohl Bereiche aus der vorderen Hufwand als auch vom Hufballen wurden verwendet. Nachdem alle anhaftenden Verschmutzungen mit Wasser und einer Bürste entfernt waren, wurden die Hufstücke getrocknet und anschließend trocken gelagert. In unterschiedlichen Stärken von 30 μm bis 60 μm wurden mittels eines Mikrotoms Membranen geschnitten. Obwohl im gequollenen Zustand gearbeitet wurde, war eine Einbettung der Proben aufgrund der hohen Festigkeit des Materials nicht erforderlich. Mittels eines Stopfenbohrers wurden die Keratinmembranen in kreisrunder Form mit definiertem Durchmesser ausgeschnitten oder mittels Skalpell in die gewünschte Form gebracht. Nach 24 Stunden Trocknung der fertigen Proben erfolgte die Lagerung in Schnappdeckelgläschen im Exsikkator. Zwar wurde die Dicke der Membranen schon beim Schneiden eingestellt, jedoch vor der Verwendung in einem Experiment nochmals mit einem Schichtdickenmessgerät bestimmt. Für die späteren Experimente fanden die Membranen, die aus den Bereichen des Hufballens stammten aufgrund ihrer deutlich geringer ausgeprägten Färbung Verwendung. Außerdem zeigte die weitere Charakterisierung mittels Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM), dass Tubuli, Versorgungskanäle im Hufwandgewebe [88], in den entnommenen Stücken der Hufwand zu finden waren (Abb.21). Um Probleme, die diese unregelmäßig auftretenden Poren bei späteren Versuchen mit sich bringen könnten, zu vermeiden, wurde die Verwendung von Membranen aus der vorderen Hufwand verzichtet.

a



b

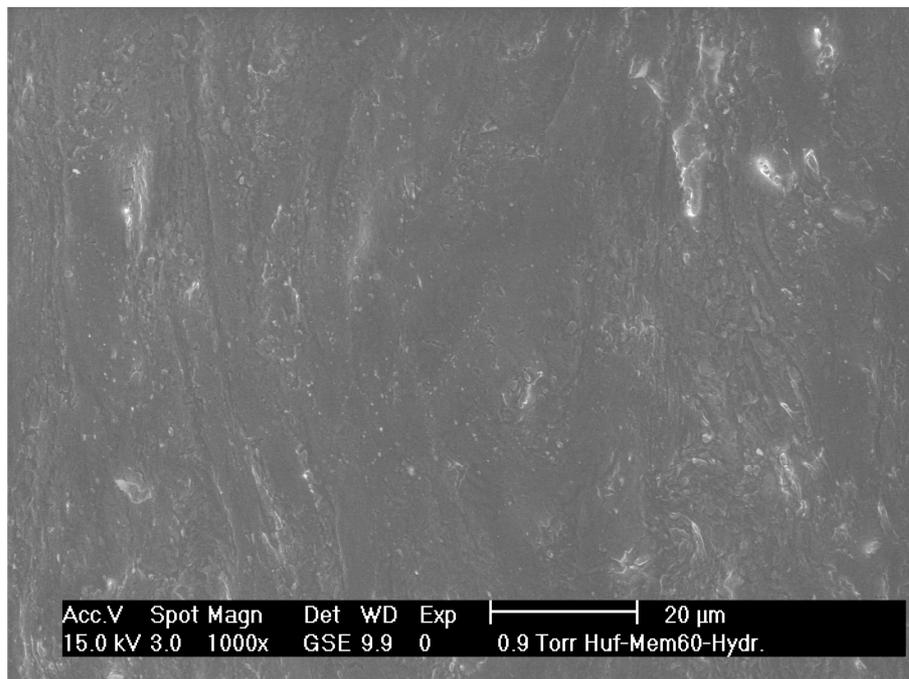


Abbildung 21:

Ausgewählte ESEM Aufnahmen der Oberfläche von Keratinmembranen aus a) der vorderen Hufwand und b) von der Rinderhufsohle. Abbildung a) zeigt angeschnittene Tubuli. Diese Strukturen wurden im Bereich der Sohle b) nicht gefunden.

3.3. Auswahl und Herstellung der Formulierungen

Für die Durchführung der Experimente wurden einfache halbfeste Formulierungen als Donatorsysteme verwendet. Wobei Vaselineum album als lipophile Grundlage und Unguentum emulsificans aquosum N als hydrophile Grundlage zum Einsatz kamen. Um eine möglichst selektive Bestimmung der Wirkstoffe zu gewährleisten, wurden Systeme gewählt, die bei den Wellenlängen der verwendeten Anregungsquellen eine geringe Absorption zeigten. Hingegen sollten die als Modellwirkstoffe angewendeten Substanzen gut detektierbar sein. Sodass neben Di, mit Mo und Cu auch Stoffe zur Anwendung kamen, deren pharmazeutische Relevanz eher gering ist, die aber analytisch gut zugänglich waren. Für die Vergleichsstudie zur Konzentrationsbestimmung in Salben wurden die dermatologisch relevanten Stoffe Me und Ke eingesetzt.

Zunächst wurde eine ausreichende Menge Wirkstoff in einem Mörser mindestens für 5 min mikronisiert. Anschließend wurde die eingewogene Arzneistoffmenge mit anteilig zugegebenem Vaselineum album, Unguentum emulsificans aquosum nonionicum oder Propylenglykol angerieben. Für letzteren Fall erfolgte die Verarbeitung mit der Grundlage im Anschluss. Nach der Herstellung wurden die Formulierungen mindestens 24 h bei Raumtemperatur bis zur Verwendung stehen gelassen, um die Einstellung des Gleichgewichtszustandes zwischen gelösten und ungelösten Bestandteilen zu gewährleisten. Für die Abfüllung der Formulierungen wurden Kunststoffkruken oder Schnappdeckelgläschen verwenden.

3.4. Substanzen

Die in Tabelle 5 aufgeführten Arzneistoffe, Hilfsstoffe, Lösungsmittel und Formulierungen wurden im Rahmen dieser Arbeit, in reiner Form oder mit anderen der genannten Stoffe verarbeitet, eingesetzt. Sofern ein Verwendbarkeitsdatum angegeben war, wurde sichergestellt, dass die Stoffe nur innerhalb der Aufbrauchsfrist verwendet wurden. Bis auf Curcumin und Methylorange, deren Qualität „für Analysenzwecke“ entsprach, waren alle Substanzen in Übereinstimmung mit den Anforderungen für Arzneimittel des Pharm. Eur.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Arzneistoffe und Grundlagen.

Substanz	Hersteller/Lieferant
Methoxsalen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ketokonazol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Curcumin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Dithranol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Methylorange	Merck, Darmstadt
Vaselineum album	Caesar-Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Collodium	Caesar-Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Ung. Em. Aq. N.	Caesar-Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Dodecanol	Carls Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propylenglycol	Caesar-Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Ether	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol 70 % Vol	Caesar-Loretz GmbH, Hilden, Deutschland

3.5. Geräte

Alle Geräte, Strahlungsquellen und Bauteile, die zum Aufbau der photothermischen Messverfahren verwendet wurden sowie die Spektrometer für die Referenzmessungen, sind in Tabelle 4 aufgelistet. Ebenso finden sich dort die Messgeräte zur Bestimmung und Herstellung der verwendeten Membranen sowie Verfahren zur Charakterisierung der Anregungsquellen.

Tabelle 4: Geräte und Bauteile.

Gerät	Modell/Hersteller
Monobloc	Phototherm Dr. Petry, Saarbrücken
CO2 Laser	Access Laser, Model LASY 3S, Marysville, WA, USA
Nd:YAG Laser	$\lambda = 532$ nm, 100 mW; B&W TEK Inc., Newark, USA
Nd:YAG Laser	$\lambda = 473$ nm, 200 mW; Laser Quantum, Manchester, UK
HeNe Laser	$\lambda = 633$ nm, 1 mW; JDS uniphase, CA, USA
Dioden Laser 685	New Focus, San Jose, CA, USA
Lock-In-Verstärker	Princeton Model 5210, EG&G, Gaithersburg, USA
Chopper	Model 3501, New Focus Inc., Santa Clara USA
Scannerspiegel	G120DT, GSI General Scanning,
Hochpräzisions-Lineartisch	Limes-60-20-HSM, OWIS, Staufen, D
Optische Bauteile	Linos, Göttingen, D
Abschwächer	M-935-10 Variabel, Newport, Inc., Irvine, USA
Thermopile	LM-3 HTD, Coherent, USA
Strahlprofilmessgerät	Spiricon Laser Beam Diagnostics, Logan, USA
Schichtdickenmessgerät	Heidenhain (Deutschland)
Rotationsmikrotom	RM 2165, Leica Microsystems, Wetzlar, D
Oszilloskope	Tektronix TDS 2012, Tektronix, Beaverton, USA
Vis Spektrometer	BTC 112 E, B&W TEK Inc., Newark, USA
Raman Mikroskop	Senterra, BrukerOptics, Ettlingen, D
Raman Spektrometer	RFS 100, BrukerOptics, Ettlingen, D
Infrarot Spektrometer ATR	IFS 28, BrukerOptics, Ettlingen, D
PAS Zelle	MTEC 200, MTEK Photoacoustics INC., Ames, USA
Laser Flash	LFA 427, Netzsch, Selb, D
ESEM	Fei Philips XL 30, Fei, Eindhoven, NL

3.6. Bestimmung der thermischen Diffusivität von Rinderhuf

Die Untersuchungen zur thermischen Diffusivität wurden an einem zylinderförmigen Stück Rinderhuf der Abmessung $d = 11,6$ mm und $h = 3$ mm mit der Masse $M = 295$ mg durchgeführt. Die Dichte wurde mittels eines Pyknometers bestimmt, sie betrug $1,294$ g/cm³. Da der reine Rinderhuf im sichtbaren Spektralbereich nahezu transparent ist und somit kein ausreichendes PD Signal erzeugt werden kann, wurde, um die Absorption zu erhöhen, die Oberfläche für die photothermischen Messungen mit einem schwarzen Farbfilm bedeckt, dessen Dicke so gering war, dass er die thermischen Eigenschaften der Probe nicht beeinflusste. Die Laser Flash Methode verwendete zur Erwärmung der Probe einen Ar⁺ Laser mit hoher Leistung, so dass eine Färbung des Hufmaterials nicht nötig war.

Die thermische Diffusivität bzw. die Temperaturleitfähigkeit α [cm^2s^{-1}] ist eine wichtige stoffabhängige Konstante, die angibt, mit welcher Geschwindigkeit sich Wärme in einem Material ausbreitet.

$$\alpha = \frac{\kappa}{\rho c_w} \quad (48)$$

α ergibt sich aus dem Verhältnis der thermischen Leitfähigkeit κ mit dem Produkt aus der spezifischen Wärmekapazität c_w und der Dichte ρ . Nach Gleichung (37) kann anhand der Modulationsfrequenz f bei bekanntem α die thermische Diffusionslänge μ berechnet werden. Mittels thermischer Diffusionslänge ist es wiederum möglich die Messtiefe des PD Signals in Abhängigkeit von der Frequenz zu bestimmen bzw. die Messtiefe einzustellen. Somit ist die Bestimmung von α die Grundvoraussetzung für die Realisierung von Tiefenmessungen.

Es existieren verschiedene Techniken, die zur Messung der Temperaturleitfähigkeit verwendet werden. Dazu gehören die photoakustische Spektroskopie [91-93], eine photopyroelektrische Methode [94] und die photothermische Ablenkungsspektroskopie [33-35, 95-98]. Eine weitere weit verbreitete Technik ist die "Flash" Methode [99].

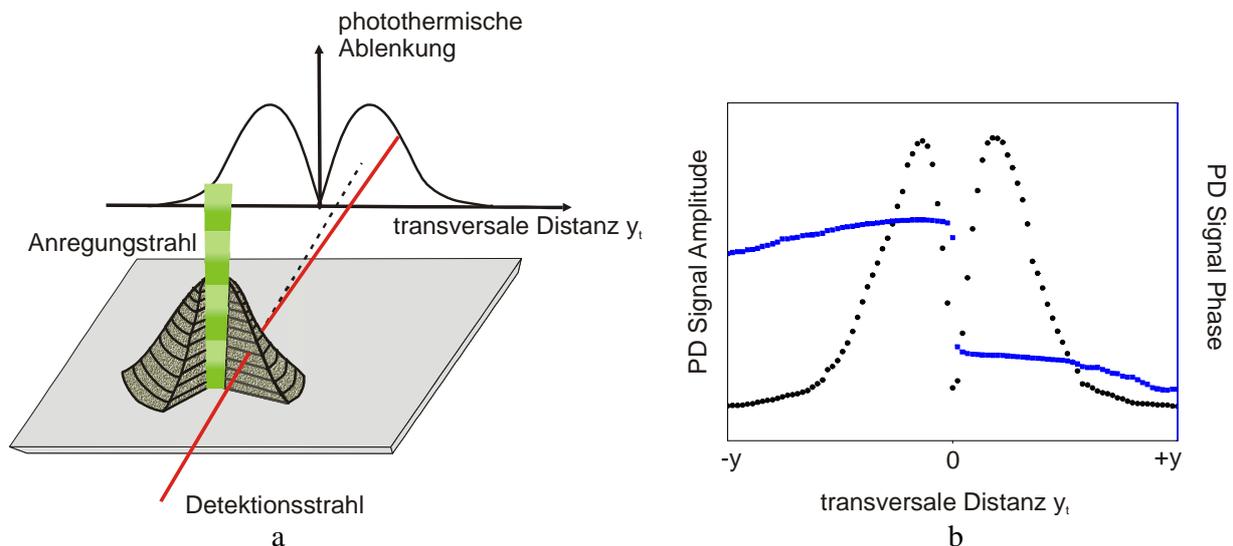


Abbildung 22:

a) Schematische Darstellung des Zero Crossing. Der Detektionslaser wird schrittweise durch die thermische Linse bewegt. b) Typischer Verlauf der Amplitude und der Phase des PD Signals über die transversale Distanz y_t .

Wird der DTL entlang der y - Achse durch die thermische Linse bewegt (vergl. Kapitel 2.1), kann das Ausmaß des induzierten Temperaturfeldes anhand der Strahlablenkung in Abhängigkeit von der Position des DTL (transversale Distanz y) dargestellt werden. Dieses Verfahren wird als Zero Crossing bezeichnet (Abb. 22 a). Als Datensatz werden Amplitude und Phase der Ablenkung in Abhängigkeit der transversalen Distanz y_t erhalten.

Exemplarisch zeigt Abbildung 22 b) den Verlauf der Amplitude A als Funktion der transversalen Distanz y_t zum Anregungslaser. Wird der Detektionsstrahl in Richtung des Zentrums der thermischen Linse verschoben, steigt das Amplitudensignal an, bis es einen Maximalwert überschritten hat, um bei $y = 0$ auf ein Minimum zu sinken. Die transversale Komponente θ_t des Ablenkungswinkels, die in der vorliegenden Arbeit zur Detektion herangezogen wurde, ist an der Position $y = 0$ als $\theta_t = 0$ definiert. Durch weiteres Verschieben des DTL wird bei einem idealen Strahlprofil T_{00} des Anregungsstrahls der Verlauf von A an $y = 0$ gespiegelt. Die Phase Φ des PD Signals läuft

mit leichter Steigung bis $y = 0$, wo sie einen Sprung von 180° zeigt. Dieser Phasensprung verläuft idealerweise von $+90^\circ$ zu -90° , wird jedoch in der Realität durch bestimmte experimentelle Parameter beeinflusst. Insbesondere ist hier der normale Versatz des DTL zur Probenoberfläche zu nennen.

3.6.1. Bestimmung der thermischen Diffusivität anhand der Zero Crossing Distanz

Um α aus den Messdaten des Zero Crossing zu bestimmen, kann nach Kuo et al. und Salazar et al. vorgegangen werden [33, 34, 95]. Danach ist die thermische Wellenlänge λ_{th} frequenzabhängig und kennzeichnet das Ausmaß y_{zc} der thermischen Linse:

$$\lambda_{th} = 2\sqrt{\frac{\pi\alpha}{f}} \quad (49)$$

$$y_{zc} = \frac{\lambda_{th}}{2} + d_L \quad (50)$$

$$y_{zc} = mf^{-1/2} + d_L \quad (51)$$

Kuo et al. definierten y_{zc} als Weg zwischen den beiden ersten nichtzentralen Nulldurchgängen des Realteils des Ablenkungssignals $\text{Re}(\theta_t)$. Dies gilt jedoch nur für einen theoretischen normalen Versatz des DTL von $z_n = 0$, da ansonsten eine frequenzabhängige Phasenverschiebung auftritt.

$$\text{Re}(\theta_t; \text{korr}) = A \cdot \cos\left(\frac{(\Phi + \Delta\Phi) \cdot \pi}{180}\right) \quad (52)$$

Die Korrektur dieser Phasenverschiebung erfolgt, indem $\text{Re}(\theta_t; \text{korr})/A$ gegen y_t aufgetragen wird und durch Anpassung von $\Delta\Phi$ ein Phasensprung von $+1$ nach -1 erfolgt. Erst dann kann der wahre Wert für y_{zc} bestimmt werden. Bei d_L handelt es sich um den Durchmesser des Anregungslasers.

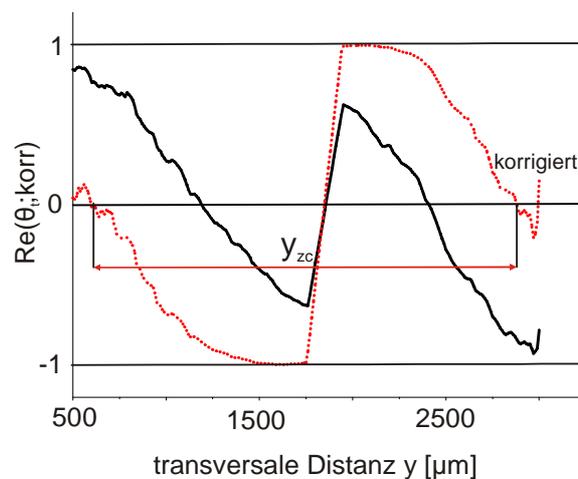


Abbildung 23:

Bestimmung der Zero Crossing Distanz y_{zc} . Es wird der korrigierte Realteil des Ablenkungssignals gegen y_t aufgetragen. Die ersten nichtzentralen Nulldurchgänge begrenzen y_{zc} .

Trägt man in einem Diagramm y_{zc} gegen $f^{-1/2}$ auf, wird der Anstieg der Geraden m erhalten. Nachfolgend kann die Temperaturleitfähigkeit aus m berechnet werden.

$$m = \sqrt{\pi\alpha} \quad (53)$$

$$\alpha = \frac{m^2}{\pi\gamma} \quad (54)$$

Nach Salazar wird der Korrekturfaktor γ eingeführt, der in der Regel den Wert $\gamma = 1$ annimmt. Für opake thermisch dicke Feststoffe wird $\gamma = 1,44$ gesetzt und in seltenen Fällen ist γ nicht definiert (Tab. 6) [95]. Die Einstufung erfolgt für die optischen Probeneigenschaften transparent und opak sowie für das Verhältnis l/μ , wobei $l/\mu \geq 2,5$ thermisch dünn und $l/\mu < 0,5$ thermisch dick bedeutet. Für das Untersuchungsmaterial Rinderhuf ergab sich $10^{-1} < \mu/l_\beta < 10^{-2}$, da die optische Absorptionslänge etwa $l_\beta = 0,1$ cm und die thermische Diffusionslänge anhand der thermischen Diffusivität für humanes Nagelmaterial als 10^{-2} cm $< \mu < 10^{-3}$ cm abgeschätzt wurde. Das Verhältnis aus der Probendicke und der thermischen Diffusionslänge der verwendeten Hufprobe betrug $l/\mu > 30$. Aus Tabelle 6 ergibt sich somit $\gamma = 1$.

Tabelle 6:

Klassifizierung von Feststoffen für die Bestimmung der thermischen Diffusivität α in Hinblick auf ihre optischen und thermischen Eigenschaften.

μ/l_β	l/μ	γ
$\leq 10^{-2}$ (transparent)	$-\infty < l/\mu < \infty$	1
$10^{-2} < \mu/l_\beta < 40$	$\geq 2,5$ $< 2,5$	1 keine Linearität
≥ 40 (opak)	$\geq 2,5$ $0,5 < l/\mu < 2,5$ $< 0,5$	1 keine Linearität 1,44

3.6.2. Bestimmung der thermischen Diffusivität unter Verwendung der Amplituden Methode

Eine alternative Vorgehensweise bei der Bestimmung von α aus den Messdaten des Zero Crossing wurde von Ravi et al. und früher von Quelin et al. vorgeschlagen [100, 101]. Laut Ravi et al. ist die Amplituden Methode für Materialien mit kleiner Temperaturleitfähigkeit sehr gut geeignet. Nach Skumanich et al. kann die Amplitude A des Ablenkungssignals erhalten werden als

$$\ln(A) = k - \frac{y_t}{\mu} \quad (55)$$

Dabei ist y_t die transversale Distanz, k ist eine von der Messanordnung abhängige Konstante und μ ist die charakteristische thermische Diffusionslänge. Indem in einem Koordinatensystem $\ln(A)$ gegen y_t aufgetragen wird, ist über die Steigung $1/\mu$ die thermische Diffusivität α nach Salazar erhältlich:

$$m = \frac{1}{\mu} = -\sqrt{\frac{\pi f}{\alpha}} \quad (56)$$

3.6.3. Laser Flash Methode zur Bestimmung der thermischen Diffusivität

Die Verifizierung der Ergebnisse aus den PBD-Experimenten geschah mit denselben Huf-Proben mit Hilfe des Laserflashverfahrens nach DIN EN 821-2 (08,97). Die Messungen wurden am Institut für Werkstoffkunde I am Forschungszentrum Karlsruhe in Form von Auftragsmessung durchgeführt [99]. Bei diesem Verfahren wird durch einen kurzen Laserpuls auf der Oberfläche einer zylindrischen Probe ein Wärmepuls erzeugt. Die Laufzeit dieses Wärmepulses von der Oberfläche zur Rückseite der Probe bestimmt bei gegebener Probendicke die Temperaturleitfähigkeit, die explizit aus dem Anstieg der Temperatur als Funktion der Zeit auf der Rückseite der Probe ermittelt werden kann. Im einfachsten Fall kann der Temperaturleitwert aus folgender Beziehung ermittelt werden:

$$\alpha = \frac{1,38 \cdot L^2}{\pi^2 \cdot t_{1/2}} \quad (57)$$

L ist die Dicke der Probe und $t_{1/2}$ ist die Zeit, die benötigt wird, bis die Temperatur auf der Rückseite der Probe auf den halben Wert ihres Maximums angestiegen ist. Somit wird die Bestimmung von α auf die Messung einer Laufzeit reduziert, wodurch die Laser Flash Methode ein vergleichsweise schnelles Verfahren ist. Die dort vorhandene Apparatur LFA427 von Netzsch verwendet zum Heizen der Probe einen gepulsten Neodym Gallium Gadolinium Laser mit einer Wellenlänge von 1064 nm. Auf der Rückseite befindet sich ein Sb-IR-Detektor, der den zeitlichen Verlauf der Aufwärmung der Probenrückseite detektiert. Die Messungen wurden unter Vakuumbedingungen und bei einer Temperatur von 100 °C durchgeführt. Die Proben werden zur vollständigen Absorption des Laserlichtes mit einer dünnen Schicht Grafit versehen.

3.7. Bestimmung der Wirkstoffkonzentration halbfester Formulierungen

Untersuchungen zum Wirkstoffgehalt von halbfesten Suspensionsformulierungen wurden mittels PDS, FTIR-PAS, FT-Raman, und FTIR-ATR durchgeführt. Halbfeste Formulierungen mit den Wirkstoffen bzw. Modellsubstanzen Methoxsalen (Me), Ketokonazol (Ke), Methylorange (Mo) und Curcumin (Cu) wurden aufgrund der Lage ihrer optischen Absorptionsbanden zur Analyse verwendet. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die zur quantitativen Auswertung verwendeten Spektralbereiche.

Tabelle 7: Zur Quantifizierung des Wirkstoffgehalts in halbfesten Suspensionen verwendete spektroskopische Methoden und die dazugehörigen spektralen Bereiche. Im Fall der photothermischen Untersuchungen (PDS) ist die Wellenzahl des CO₂ Laser oder die Wellenlänge (Nd:YAG Laser) angegeben.

Methode	Methoxsalen [cm ⁻¹]	Ketoconazol [cm ⁻¹]	Methylorange [cm ⁻¹]	Curcumin [cm ⁻¹]
PDS	978	978	532 nm	473 nm
FTIR-PAS	1560 - 1840	1540 - 1740	1150 - 1250	1250 - 1321
FT-Raman	1660 - 1760	1530 - 1660		
FTIR- ATR	1530 - 1750	1560 - 1660		

3.7.1. Konzentrationsuntersuchungen mittels PDS

Die Messungen wurden mittels der Monobloc Einheit durchgeführt. Zur Anregung der Me und Ke Formulierungen wurde ein CO₂ Laser auf eine Wellenzahl von 978 cm⁻¹ eingestellt (Abb. 24). Die Laserleistung konnte zwischen 5 mW und 100 mW variiert werden. Die Leistung wurde für jeden Versuch angepasst und blieb dann während der Messung konstant. Die Modulation des Anregungsstrahls erfolgte mit 16, 20, 24, 28 und 32 Hz, da in diesem Frequenzbereich das Signal/Rauschen Verhältnis am besten war. Um möglichst konstante Bedingungen für die quantitativen Messungen zu gewährleisten, wurde ein Probenhalter verwendet, der die Messung der gesamten Konzentrationsreihe in einem Arbeitsschritt ermöglichte. Es handelt sich dabei um eine rechteckigen Probenhalter (4 x 30 mm²) aus Messing, auf dem sich hintereinander sechs Vertiefungen (0.25x0.5x1 mm³) zum Einbringen des Probenmaterials befanden. Die so präparierte Halterung wurde auf dem x;y positionierbaren Tisch befestigt, welcher während der Messung motorisiert die Probe unter der Strahlanordnung bewegte, so dass die komplette Oberfläche gemessen werden konnte. Als Resultat wurde ein photothermisches Bild erhalten, bei dem jeder x;y Position ein PD Signal zugeordnet war. Diese Werte wurden für die Bereiche, die die Formulierungen enthielten extrahiert und ausgewertet, indem die Mittelwerte des PD Signals von jeweils sechs Flächeneinheiten pro Konzentration gemittelt wurden.

Nachdem der PD-Scanner fertig gestellt war, sollte dieser in Hinblick auf Nachweisempfindlichkeit und Quantifizierung von Wirkstoffen in halbfesten Formulierungen mit der Monobloc Einheit verglichen werden. Da die optischen Komponenten, wie Linsen und Spiegel, nicht für den infraroten Bereich ausgelegt war, wurden die Untersuchungen mit Anregungsquellen im sichtbaren Spektralbereich durchgeführt. Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, liegen die Absorptionsmaxima von Mo und Cu im Bereich der Wellenlänge der Nd:YAG Laser, weshalb diese für die Vergleichsuntersuchungen zwischen Monobloc Einheit und PD Scanner verwendet wurden. Da beim PD Scanner nicht mehr die Probe bewegt wird, sondern beide Laser die Probe abstrahlen, ist der messbare Bereich im Vergleich zur Monobloc Einheit reduziert. Deshalb wurden pro Konzentration Punktmessungen durchgeführt.

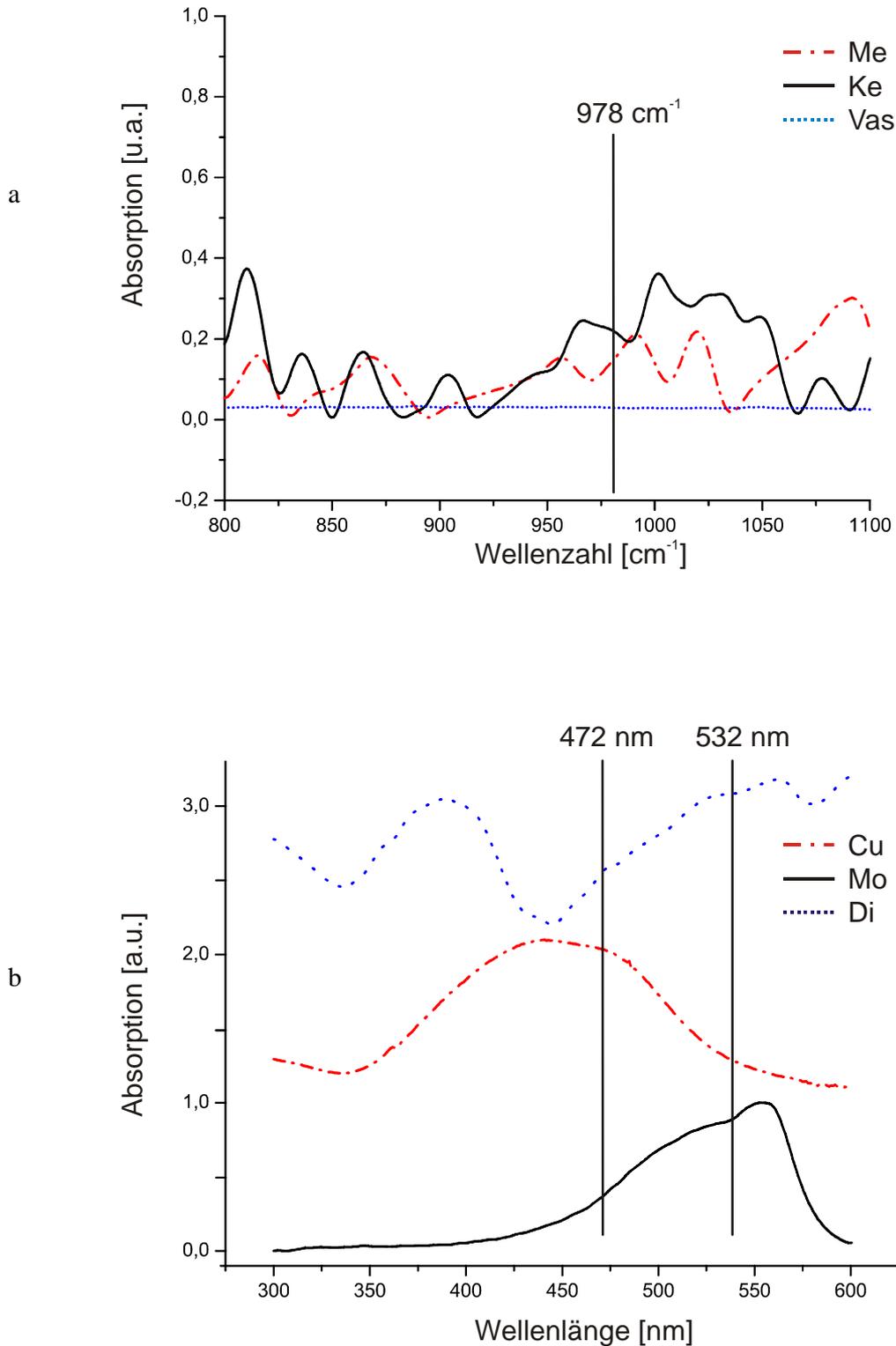


Abbildung 24:

a) Ausschnitt aus IR Spektren von Vaseline, Ketokonazol und Methoxsalen. Sowohl Ke als auch Me zeigen bei der Wellenzahl 978 cm^{-1} des CO₂ Lasers zwar keine ausgeprägte Absorptionsbande, besitzen aber höhere Absorptionswerte als die Grundlage Vaseline. b) Ausschnitt aus UV-Vis Spektren von Curcumin (Cu), Methylorange (Mo) und Dithranol (Di) und als senkrechte schwarze Linien die Wellenlängen der verwendeten Laser.

Hierbei musste besonders auf die identische Geräteeinstellung (wie Abstand Messlaser zu Probenoberfläche, Abstand von Mess- und Anregungslaser) für jede Messung geachtet werden. Die Formulierungen wurden in Probengefäße (Volumen 9,8 mm³), welche auch bei den PAS Messungen zum Einsatz kamen, gefüllt und an deren Oberkante glatt abgestrichen, so dass sich eine ebene horizontale Fläche ergab, die dann mittels PD-Scanner an mindestens 3 Positionen gemessen werden konnte. An jedem Messpunkt wurde das PD-Signal in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz von 4 bis 100 Hz gemessen. Das Messintervall betrug 1 Hz. Um eine Stabilisierung der thermischen Linse zu gewährleisten, durchlief der Chopper 10 Zyklen, bevor der Messwert aufgezeichnet wurde.

3.7.2. Konzentrationsuntersuchungen mittels FTIR-ATR und -PAS

Die Aufnahme der IR Spektren erfolgte unter Verwendung eines Spektrometers des Typs IFS 28 der Firma Bruker, welches mit einer horizontalen ATR Einheit (Spectra-Tec, Thermo) mit Einfachreflexion ausgestattet war. Der Messbereich war ein ATR Kristall aus ZnSe mit einem Einfallswinkel des IR Strahls von 45°. Zur Messung wurde jede Suspension direkt auf dem ATR Kristall dispergiert. Die IR Strahlung wurde durch einen DTGS Detektor aufgenommen. Pro Messung wurden 32 Scans mit einer spektralen Auflösung von 2 cm⁻¹ angefertigt.

Die FTIR-PAS Untersuchungen wurden mit demselben Spektrometer durchgeführt, wofür es mit einer Photoakustik Zelle (MTEC 200 bzw. MTEC 300) versehen wurde. Die Formulierungen wurden in die PAS Zelle passende runde Gefäße (Volumen 9,8 mm³) gefüllt. Es wurden step scan Messungen mit Phasenmodulation im Bereich 16 – 54 Hz und einer Amplitude von $2\lambda_{\text{HeNe}}$ (1266 nm) durchgeführt. Jedes Spektrum wurde durch 4 Coadditionen und mit einer Auflösung von 10 cm⁻¹ unter Verwendung der Norton-Beer Medium Apodisation aufgenommen. Alle Spektren wurden mit Hilfe der „carbon black“ Methode normiert, um gerätebedingte Fehler auszuschließen. Der Probenraum wurde vor jeder Messung 30 s mit He gespült, um störendes CO₂ und H₂O zu entfernen und da die He Atmosphäre in der Probenkammer die Signalintensität erhöht. Die Datenbearbeitung und –auswertung erfolgte mittels OPUS Software.

3.7.3. Konzentrationsuntersuchungen mittels FT Raman Spektroskopie

Als weiteres Standardverfahren wurde die FT-Raman Spektroskopie eingesetzt. Die Raman Streuung wurde in einem Winkel von 90° zum Anregungsstrahl mittels eines FT-Raman Spektrometers RFS 100/S gemessen. Als Quelle wurde ein Nd:YAG Laser (Wellenlänge 1064 nm) mit einer Leistung von 300 mW verwendet. Die Formulierungen wurden in Standardprobentiegel des Spektrometers gefüllt und glatt abgestrichen, so dass die Messung direkt auf der Probenoberfläche stattfand. Pro Durchgang erfolgten 200 Scans. Die Datenbearbeitung und –auswertung erfolgte mittels OPUS Software.

3.8. Vorgehensweise zur Untersuchung der Wirkstoffpenetration und –diffusion in Membranen mittels PDS und Raman Mikroskopie

Das Verhalten von Wirkstoffen in halbfesten Formulierungen ist während des Freisetzungprozesses *in situ* nur sehr schwer zu verfolgen. Zur Charakterisierung der Freisetzung wird daher meist der Anteil des Wirkstoffs bestimmt, der in den Akzeptor übergeht. Als Akzeptormedien kommen für die Betrachtung halbfester Formulierungen besonders Membranen künstlicher und biologischer Herkunft als Hautmodellmembranen in Frage. Damit das Medium die freigesetzten Substanzen „akzeptiert“, spielt die Löslichkeit des Wirkstoffs im Akzeptor eine wichtige Rolle. Sie muss gegeben sein, damit eine Penetration stattfinden kann. Diese erfolgt dann auf kürzestem Weg in direkter Richtung in die Membran. Diffundieren die Moleküle entsprechend des Konzentrationsgefälles weiter in das nächste Kompartiment, wird von Permeation gesprochen. Die Be-

stimmung von Permeations- und Diffusionskoeffizienten erfolgt durch Anwendung von Diffusionszellen. Die Konzentrationsänderung im Kompartiment nach der Membran wird in Abhängigkeit von der Zeit registriert und kann dann zur Dicke der Diffusionsbarriere in Beziehung gesetzt werden [5, 102-107].

Kontaktlose optische Messtechniken, insbesondere die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PDS und Raman Mikroskopie, bieten die Möglichkeit der *in situ* Untersuchung der Penetration und überdies der lateralen Diffusion direkt in der Akzeptormembran.

Für das Gesamtverständnis des Verteilungsprozesses von Wirkstoffen in Membranen ist auch deren laterale Diffusion von Wichtigkeit. So bilden einige lipophile AS ihre Depotwirkung in der Haut durch laterale Diffusion aus [108]. Laut Johnson et al. können auch kleine gelöste Moleküle in den Bilayern des Stratum corneum lateral beachtliche Distanzen zurücklegen [109-111]. Die genannten Methoden, hierbei insbesondere die PDS und Konfokale Raman Mikroskopie, bieten in fast einzigartiger Weise die Möglichkeit mit hoher räumlicher Auflösung in kontaktloser Weise solche Prozesse zu betrachten.

3.8.1. Experimentelle Konfigurationen der Membranmessungen

Anhand einfacher Versuchsaufbauten sollten mögliche Vorgehensweisen für Penetrations- oder Freisetzungsversuche ermittelt werden. Sämtliche Halterungen und Probenbefestigungssysteme wurden für spezielle Anwendungen entwickelt und von den Werkstätten des IFP der MLU oder des IFG am KIT hergestellt. Im Folgenden sollen die verwendeten Versuchsaufbauten jeweils schematisch dargestellt werden. Generell wurden drei Arten von Experimenten durchgeführt.

- 1) Experimente zur Untersuchung des lateralen Transports von Wirkstoffen in Membranen (Abb. 25). Um die laterale Diffusion in Membranen zu verfolgen, wurden einfache Probenhalter aus Aluminium verwendet. Die Membranen konnten entweder ohne weitere Befestigung direkt aufgelegt werden, oder wenn erforderlich (z. Bsp. bei Keratinmembranen), gab es seitliche Schraubzwingen zu deren Fixierung.
Um den Kontakt zwischen Donator und Akzeptor zu gewährleisten, waren in die Auflagefläche Vertiefungen eingelassen, in welche die Formulierung vor dem Ablegen der Membran gefüllt werden konnte. Ebenso war es möglich ein Gefäß umgekehrt von oben auf die Membran zu setzen (Abb. 25 Variante a oder b).
Die direkte, dem Experiment mitlaufende Messung, erfolgte dann an einem Punkt konstanter Distanz l zur Grenzfläche der Formulierung (Abb. 25 L1). Wurde ein an die Formulierung angrenzendes Areal gescannt, soll dies als L2 bezeichnet werden.
- 2) Experimente, die die Penetration des Wirkstoffs in die Membran normal zum Donator charakterisieren sollten (Abb. 26). Die gleichen Vorrichtungen konnten auch für die Experimente zur direkten Untersuchung der Penetration von Substanzen verwendet werden. Im Unterschied zur vorherigen Methode, wurde der Messpunkt (T1) oder das Messgebiet (T2) oberhalb der Formulierung platziert, so dass direkt an der Grenzfläche Membran/Formulierung gemessen werden konnte (Abb. 26). Damit war eine Variante a wie in Abbildung 25 ausgeschlossen.
- 3) Die nachträgliche Untersuchung von Membranen, in die bereits eine Wirkstoffpenetration stattgefunden hatte, erfolgte prinzipiell wie L und T jedoch ohne zeitliche Auflösung.

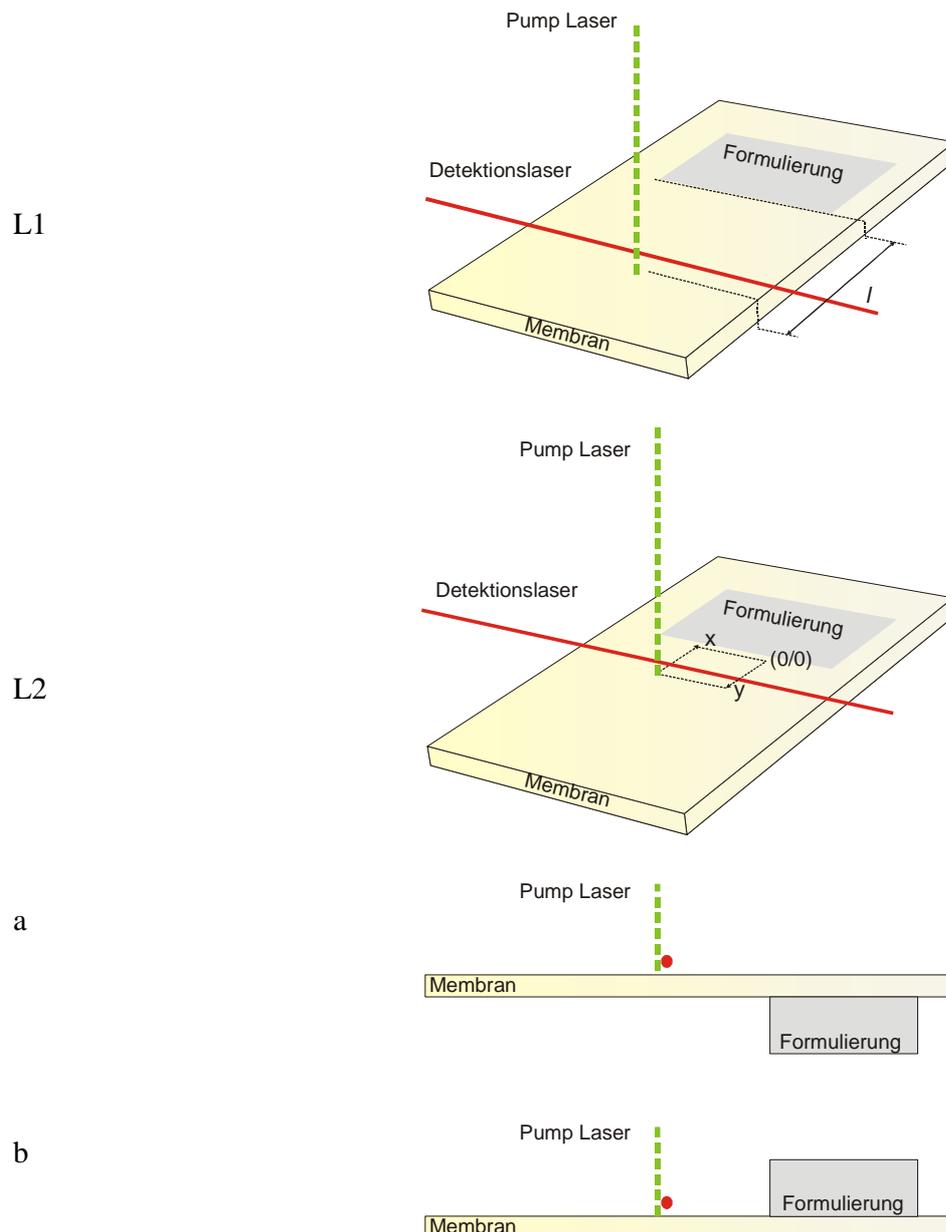


Abbildung 25: Prinzipielle Messanordnungen zur Untersuchung der lateralen Diffusion von Substanzen in Membranen mittels PDS und Raman Mikroskopie (für letzteren Fall ohne Detektionslaser).

Bei allen im Folgenden dargestellten Flächenmessungen ist die Koordinate 0;0 (x;y) jeweils die mit der kürzesten Distanz zur Formulierung bzw. zur Diffusionsgrenzfläche. Alle Messungen wurden in offener Raumatmosphäre durchgeführt. Zur Vermeidung von störenden Luftverwirbelungen wurde die Messanordnung in einer Kunststoffbox angebracht. Die Box stand in keinerlei direktem Kontakt zu den Bestandteilen der Probe. Die Wände waren an den Stellen, die von den Lasern passiert wurden, mit Öffnungen versehen. Nach dem Auflegen der Membran wurde die Messung innerhalb von 2 Minuten gestartet. Die entwickelte Software FK-TL oder TL-Scan erlaubte automatische Wiederholmessungen. Damit war es möglich die dynamischen Prozesse der Wirkstoffpenetration zeitlich aufgelöst zu verfolgen. Diese Wiederholmessung stand sowohl für die Punktmessung, als auch den Imaging Modus zur Verfügung. Da Vergleichsmessungen mit dem Raman Mikroskop in identischer Anordnung vorgenommen wurden, gelten die Experimentbezeichnungen aus Abbildungen 25 und 26 auch für Raman Messungen.

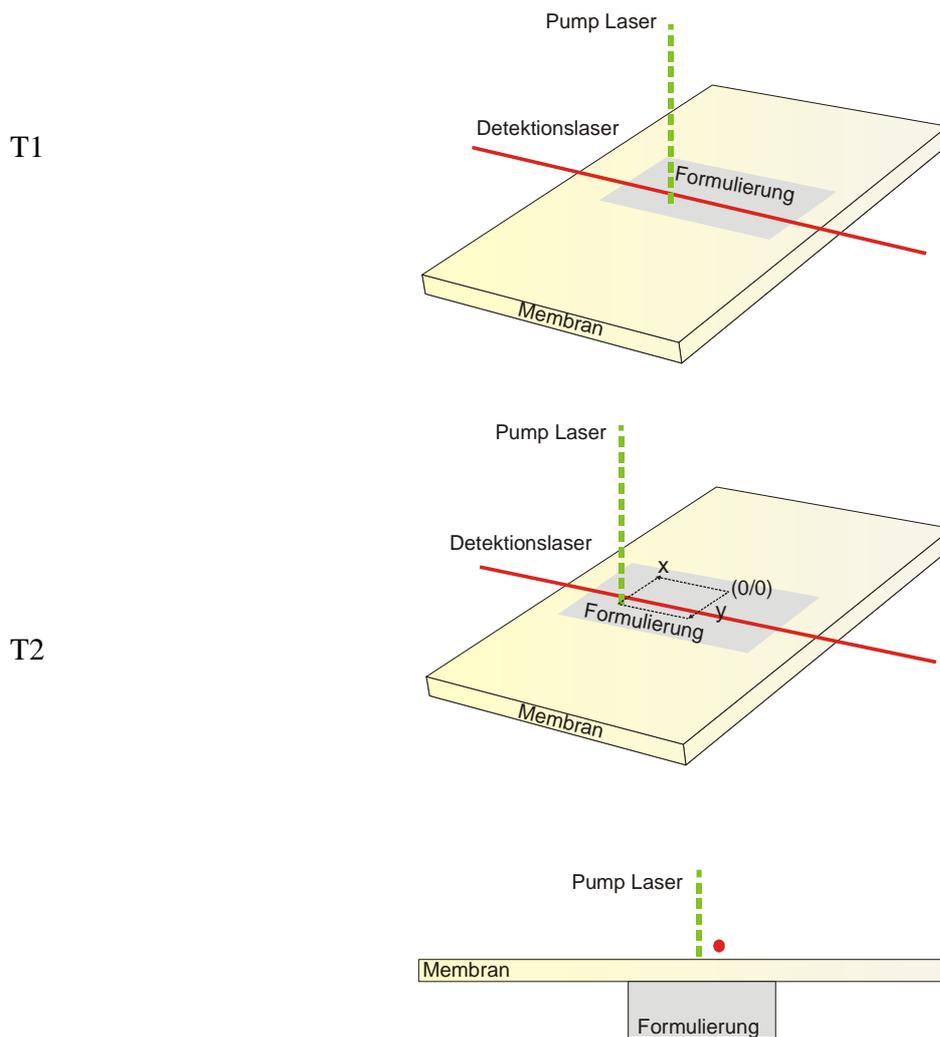


Abbildung 26: Messanordnungen zur Untersuchung der Penetration bzw. des Stoffübergangs aus halbfesten Formulierungen in Membranen *in situ* mittels PDS und Raman Mikroskopie (für letzteren Fall ohne Detektionslaser).

Die Bestimmung der Entfernung zwischen Messpunkt und Diffusionsgrenze wurde je nach Messaufbau auf zwei Weisen realisiert.

Handelte es sich um einen Versuch der Form Lb oder T, wurde die Distanz bestimmt, indem die Probe im Messaufbau so verfahren wurde, dass das Probengefäß gerade in den Strahlengang des DTL hineinragte und dessen Signal auf dem Detektor verschwand. Diese Position befand sich also 250 μm von der Diffusionsgrenze entfernt, was der Wandstärke des Probengefäßes entspricht. Anschließend wurde die Probe bzw. der Messpunkt soweit in y-Richtung bewegt, bis der gewünschte Abstand eingestellt war.

Für den Fall, dass die Formulierung unterhalb der Membran war, wurde anhand des Phasensprungs an der Grenze Probenhalter / Formulierung die Position 0/0 nachträglich bestimmt (vergleiche 4.2.2 Abb. 40).

3.8.2. Bestimmung des lateralen Diffusionskoeffizienten

Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wurde anhand der Messung des lateralen Transports in Membranen durchgeführt. Durch Punktmessungen nach dem Schema L1b bei variierender Distanz l zur Diffusionsgrenze sollte in Abhängigkeit von l das Zeitintervall t_{lag} erhalten werden. Betrachtet man den Membranbereich zwischen Diffusionsgrenze und Messpunkt als ein von zwei Flächen bei $x = 0$ und $x = l$ eingefasstes Akzeptormedium, ist die Konzentration c in Abhängigkeit von Ort und Zeit nach Crank zugänglich (vergleiche Kapitel 2.3) [66]. In der Auftragung c/c_{max} gegen t ergibt der extrapolierte ansteigende Kurvenast den Schnittpunkt mit der t -Achse, der von Crank als "time lag" definiert wird, als $t_{lag} = l^2/6D$. Sind dagegen t_{lag} sowie die Dicke l der Diffusionsschicht bekannt, kann der Diffusionskoeffizient D bestimmt werden.

Als Modellmembranen wurden DDC Membranen 4 % verwendet, deren Dicke $L = 0,060 \text{ mm} \pm 0,005 \text{ mm}$ und deren Radius $r = 5,5 \text{ mm}$ betrug (Akzeptorvolumen $V_a = 1,07 \text{ mm}^3$) bzw. DDC Membranen 2 % mit einer Dicke $h = 0,0025 \text{ mm} \pm 0,002 \text{ mm}$ und $r = 5,5 \text{ mm}$ ($V_a = 0,238 \text{ mm}^3$). Eine Suspension aus Vaselium album mit 5 % DI diente als Donator. Diese hohe Konzentration wurde gewählt, um der Bedingung, $c_l = \text{konstant}$, möglichst nahe zu kommen. Die Membranen wurden auf einem Probenhalter platziert und mittels der Verschiebeeinheit an die Messposition gebracht. Die Formulierung wurde in einem PAS Probengefäß ($r = 3,5 \text{ mm}$; $L = 2 \text{ mm}$; Donatorvolumen $V_d = 76,97 \text{ mm}^3$) mit der offenen Seite auf der Membran angebracht, so dass der Kontakt zwischen Formulierung und Membran hergestellt war. Unmittelbar nach dem Platzieren der Formulierung, wurde die Entfernung zwischen dem Messpunkt und der Diffusionsgrenze, der inneren Kante des Probengefäßes, eingestellt und die Messung im Anschluss daran gestartet. Die Distanz wurde gemäß Abschnitt 3.8.1 auf $l = 1000 \text{ } \mu\text{m}$, $l = 2000 \text{ } \mu\text{m}$ und $l = 2500 \text{ } \mu\text{m}$ eingestellt. Große Diffusionsschichtdicken sollten lange Zeitintervalle für t_{lag} bedingen und somit zu einer guten Ablesbarkeit von t_{lag} führen. Zur Bestimmung von D wurde der Monobloc Aufbau verwendet. Als Quelle für die Anregung fand ein Nd:YAG Laser $\lambda = 473 \text{ nm}$ Anwendung, dessen Leistung, auf der Probe gemessen, 3 mW betrug. Die FK-TL Scan Software ermöglicht es, Wiederholmessungen durchzuführen, die ihrerseits wiederum über die Modulationsfrequenz variiert wurden. Es wurde ein Messintervall von 30 min eingestellt. Jede Messung erfolgte von 15 Hz bis 100 Hz (Intervall 5 Hz).

Die wahre Wirkstoffkonzentrationen in den DDC Membranen konnte anhand der PD Messungen nicht ermittelt werden, deshalb wurde eine normierte Darstellung der Messergebnisse in der Form A/A_{max} gewählt. Zur Ermittlung der Wirkstoffkonzentrationen in der Membran wurde die Raman Mikroskopie verwendet. Der experimentelle Aufbau der Raman Studien war mit dem der PD Versuche identisch. Ebenso wurden in definiertem Abstand l zur Diffusionsgrenze zeitabhängig Messungen mit dem Raman Mikroskop Senterra durchgeführt. Die für Di spezifische Raman Bande 616 cm^{-1} wurde zur Bestimmung der DI Konzentration herangezogen. Um die Flächen der Wirkstoffbanden mit den Konzentrationen zu korrelieren, wurden zunächst wirkstoffhaltige DDC Membranen im Bereich von 0,1 % bis 2,5 % Di-Gehalt hergestellt und mit dem Raman Mikroskop gemessen ($n > 10$). Ein Dioden Laser der Wellenlänge $\lambda = 785 \text{ nm}$ mit 100 mW Ausgangsleistung wurde durch ein 20x Objektiv auf die Probe fokussiert. Die Messzeit betrug 3×60 Sekunden. Die Spektren wurden mit der OPUS-Software nachbearbeitet, indem eine Grundlinienkorrektur mit anschließender Vektornormierung vorgenommen wurde. Mithilfe der erhaltenen Geradengleichung $AUC_{616} = 0,004 \cdot c + 0,00106$ ($R^2 = 0,992$) konnten die Wirkstoffkonzentrationen der Membranen während der Diffusionsuntersuchungen erhalten werden.

3.8.3. Tiefenmessung

Vielen Messverfahren mangelt es an der Möglichkeit den Prozess der Penetration in Membranen *in situ* zu untersuchen. Die PD Technik hingegen bietet diese Eigenschaft. Die Messtiefe kann in gewissem Ausmaß variiert werden. Konzentrationsänderungen eines Arzneistoffs in einer Membran können somit nicht nur zeitaufgelöst, sondern auch aufgelöst nach der Messtiefe dargestellt werden. Eine wesentliche Voraussetzung dafür ist, dass die optische Absorptionslänge deutlich größer als die thermische Diffusionslänge ist $l_{\beta}(\lambda_{Anregung}) > \mu$, dabei wird μ der Messtiefe gleichgesetzt (vergleiche Kapitel 2.1.4). μ kann mittels Gleichung (37) aus der thermischen Diffusivität α und der Modulationsfrequenz f des AL erhalten werden.

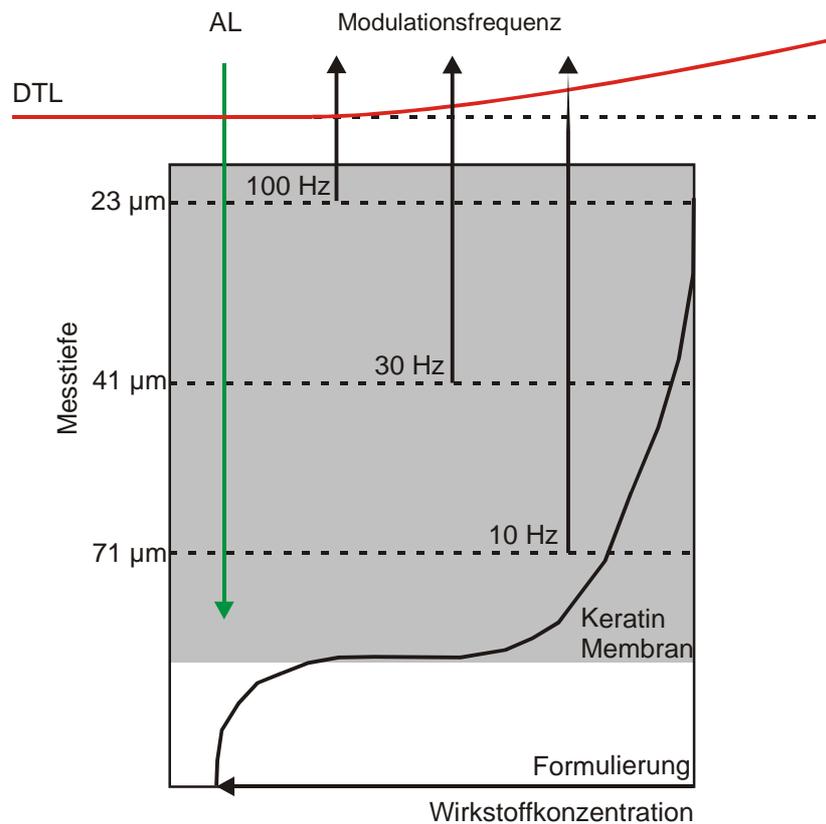


Abbildung 27:

Schema des Versuchs zur Tiefenmessung in einer Keratinmembran mit Modulationsfrequenzen und zugehörigen Messtiefen ($\alpha = 1,59 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$) sowie dem Konzentrationsgradient zum Zeitpunkt t .

Anhand des Vergleichs der Freisetzung von Mo aus zwei Formulierungen

- | | |
|----|-------------------------------|
| F1 | Mo 5 % in Unguentum em. aq. N |
| F2 | Mo 5 % in Vaselinum album |

und der Penetration in hydrophile Keratinmembranen sollte die Anwendung der PDS für tiefenaufgelöste Messungen demonstriert werden. Als Modellwirkstoff kam Methylorange (Mo) zur Anwendung, da sich diese Substanz einerseits im Vergleich zu Di und Cu als deutlich stabiler gegenüber photochemischen Prozessen erwies. Eine hohe Lichteinheit des Analyten war für diesen Versuch von besonderer Wichtigkeit, da Wiederholmessungen an gleicher Position eine erhöhte Strahlenbelastung des Wirkstoffs erwarten ließen. Außerdem zeigt Mo im Gegensatz zu Cu

und Di eine höhere Löslichkeit in Wasser (etwa 1:200), die die Voraussetzung für die Penetration in die hydratisierte Keratinmembran darstellte.

Als Akzeptorsystem wurden Keratinmembranen aus Rinderhuf eingesetzt. Der experimentelle Aufbau erfolgte nach Variante T1, indem 2 Membranen ($L = 45 \mu\text{m}$) übereinander angebracht wurden, so dass eine Gesamtschichtdicke von $L = 90 \mu\text{m}$ entstand. Um eine möglichst ebene Oberfläche zu erreichen, wurden die äußeren Bereiche der Hufmembran über kleine Schraubzwingen fixiert. Der Hydratisierungszustand dieser Membranen ist bei normaler Raumatmosphäre eher gering. Laut Bertram und Gosline weist Rinderhuf bei 75 % bzw. 53 % rF einen Wasseranteil von 18,2 % m/m bzw. 11,7 % m/m auf. Maximale Hydratisierung erreichten sie durch direkten Kontakt mit Wasser, was in einem Wassergehalt von 40,2 % m/m resultierte [88]. Mittels eines wasserführenden Dochts aus Zellstoff, der die Membran zum Großteil bedeckte, wurde die gleichmäßige maximale Hydratisierung der Membran während des Experiments sichergestellt. Ein mit Formulierung gefülltes Gefäß (vergleiche Kapitel 3.8) wurde direkt vor Beginn des Versuchs von „unten“ an die eingespannte Keratinmembran herangeführt und mit ihr in Kontakt gebracht. Für die PD Untersuchungen wurde ein Nd:YAG Laser ($\lambda = 473 \text{ nm}$, 5 mW auf der Probe) als Anregungsquelle verwendet. Die Modulation der Frequenz erfolgte zwischen 10 Hz und 100 Hz (Intervall 5 Hz). Ein Messpunkt wurde alle 20 Minuten mittels Monobloc Einheit aufgezeichnet. Die Referenzmessung erfolgte mit Raman Mikroskop Senterra. Die Anregung erfolgte mit einem Diodenlaser ($\lambda = 785 \text{ nm}$, 50 mW Ausgangsleistung), der durch ein 100x Objektiv $5 \mu\text{m}$ unterhalb der Probenoberfläche fokussiert wurde. Die Spektren wurden in 10 Minuten Intervallen aufgenommen und anschließend einer Basislinienkorrektur sowie einer Normierung auf die Bande der Streckschwingung (C-C) im Benzolring des Phenylalanins, die bei 1002 cm^{-1} lokalisiert ist (Abbildung 51) [112].

4. Resultate und Diskussion

4.1. Vergleich der PDS mit anderen optischen Messverfahren anhand der Bestimmung des Wirkstoffgehalts halbfester Zubereitungen

Eine der ersten Untersuchungen sollte klären, inwieweit die PDS in Hinblick auf den Nachweis und die Quantifizierung von Wirkstoffen geeignet und mit anderen analytischen Verfahren vergleichbar ist. Halbfeste Formulierungen mit den Wirkstoffen bzw. Modellsubstanzen Methoxsalen (Me), Ketokonazol (Ke), Methylorange (Mo) und Curcumin (Cu) wurden als Modellformulierungen eingesetzt. Mittels PDS, FTIR-PAS, FT-Raman und FTIR-ATR wurden Konzentrationsreihen dieser Formulierungen im Bereich von 0,5 % bis 10 % gemessen und Kalibrierungen erstellt. Anhand von Validierungsparametern wie Linearität, Nachweisgrenze, Spezifität und Bestimmtheitsmaß soll die Eignung der PDS für derartige Untersuchungen im Folgenden im Vergleich zu den genannten Methoden diskutiert werden [113].

Die Messung der Konzentrationsreihen der Suspensionen erfolgte, wie in Abschnitt 3.7 beschrieben. Beispielhaft sind einige Messergebnisse in Form von Spektren-Ausschnitten mit den jeweils verwendeten Methoden in Abbildung 29 bis 31 dargestellt. Die Abhängigkeit der Intensität verschiedener Banden von der Wirkstoffkonzentration wird bereits in den Spektren erkennbar. Zur quantitativen Auswertung wurden spezifische Banden der Substanzen integriert und auf die vorliegenden Konzentrationen bezogen. Im Gegensatz zu den Vergleichsmethoden wird bei PD Messungen kein Spektrum der Probe erzeugt, sondern mit monochromatischer Strahlung gezielt ein Bestandteil der Probe zur Absorption gebracht. Laut dem Lambert-Beerschen-Gesetz $A = \beta(\lambda) \cdot c \cdot d$ ist die Absorption neben der Schichtdicke d und dem optischen Absorptionskoeffizienten β auch von der Konzentration c des Analyten abhängig. Dabei sind im vorliegenden Fall $\beta = konst.$ und $d = konst.$, denn β ist als Materialkonstante der Absorptionskoeffizient der wirkstoffhaltigen Formulierung und d entspricht hier der thermischen Diffusionslänge μ (vergl. Abbildung 6, Fall 6). Somit ist die Absorption der Strahlung und folglich das PD Signal proportional zur Konzentration des Wirkstoffs und eine Korrelation kann vorgenommen werden. Die PD Messungen zur Wirkstoffkonzentration wurden mit der Monobloc Einheit nicht, wie mit den anderen spektroskopischen Methoden, als Punktmessungen durchgeführt, sondern mittels photothermischer Bildgebung.

Ein Probenhalter, der fünf Konzentrationen einer Zubereitung sowie die Grundlage enthielt, wurde photothermisch gescannt. Jedes PD Signal wurde anschließend seiner Position im Messbereich zugeordnet, wodurch ein photothermisches Bild entstand. Abbildung 28 zeigt das PD Image des Probenhalters mit Mo Formulierungen unterschiedlicher Konzentration. Von Rot nach Schwarz nimmt die Signalintensität ab. Die Korrelation von Konzentration und PD Signalintensität ist gut zu erkennen. Der Probenhalter (Messing) erzeugt nur ein geringes Grundrauschen.

Alle verwendeten Methoden waren spezifisch im Nachweis der verschiedenen Analyten. Während für die Vergleichsmethoden spezifische Absorptionsbanden der Wirkstoffe für deren Nachweis bzw. deren Quantifizierung ausgewertet wurden (Abb. 29 bis 31), wurden für die PD Messungen Anregungsquellen verwendet, deren Wellenlänge charakteristischen oder lokalen Absorptionsbanden der Analyten entsprach (Abb. 24). Anhand von Kalibriergeraden (Abb. 28 b zeigt das Beispiel einer Kalibriergeraden einer PD Messung), die durch lineare Regression der Messdaten erhalten wurden, konnte gezeigt werden, dass Linearität für alle Messreihen im untersuchten Bereich gegeben war. Die Korrelation war mit $R^2 > 99,5$ für alle Messreihen im linearen Bereich. Durch die wiederholte Bestimmung von Proben einer Charge mit demselben Messgerät kann eine Aussage über die Präzision einer Methode getroffen werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wiederholstandardabweichung sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die niedrigsten Werte für die Wiederholstandardabweichung wurden mittels FT-Raman und FTIR-PAS Spektroskopie er-

zielt. Die signifikant höheren Werte, die sowohl mit der ATR als auch PD Methode erreicht wurden, lassen sich zum Teil mit den unterschiedlichen Durchmessern der auf die Probe fokussierten Strahlen der jeweiligen Quellen erklären. Der Durchmesser des für die Raman Messungen verwendeten Nd:YAG Lasers beträgt auf der Probe $d \geq 100 \mu\text{m}$, der Durchmesser des IR-Strahls in der PAS Zelle ist $d \approx 6 \text{ mm}$. Das Messsignal wird über die gesamte bestrahlte Fläche integriert und entspricht somit einem Mittelwert des Bulks. Wird eine Suspension mit Teilchengrößen bis $30 \mu\text{m}$ oder $40 \mu\text{m}$ lediglich in einer Oberflächenschicht von $2 \mu\text{m}$, wie bei der ATR Technik, untersucht, sind Schwankungen in den Ergebnissen einer Methode erklärbar. Ein ähnlicher Grund ist für die hohen Standardabweichungen der PDS vorhanden. Aus messtechnischen Gründen werden fokussierte Laserquellen verwendet, so dass für Quellen im sichtbaren Spektralbereich der Durchmesser eines Laserspots sehr klein ist ($d_L \leq 100 \mu\text{m}$). Dies ermöglicht einerseits eine hohe örtliche Auflösung, andererseits können sich bei der Untersuchung von im Mikrometerbereich inhomogenen Proben (Suspensionen), je nach Lokalisation des Messpunktes, zum Teil deutliche Schwankungen ergeben.

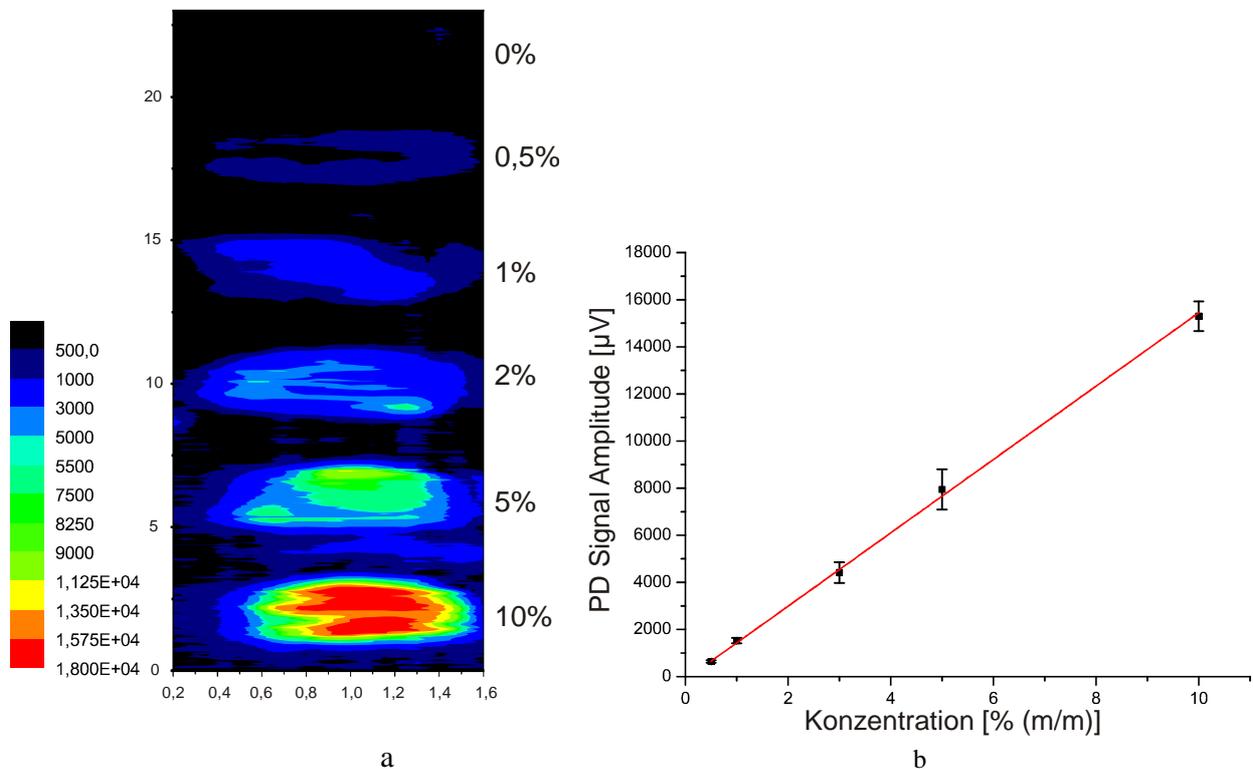


Abbildung 28:

a) Zweidimensionales photothermisches Bild eines Probenhalters, der in 6 Vertiefungen halbfeste Suspensionen verschiedener Konzentrationen [% (m/m)] aus Methylorange und Vaselineum album enthält. b) Dazugehörige Kalibriergerade der Form $A=mc+b$ ($m=1557$ und $b=-127$ $R^2 = 0,9981$). (Methode: PDS Monobloc)

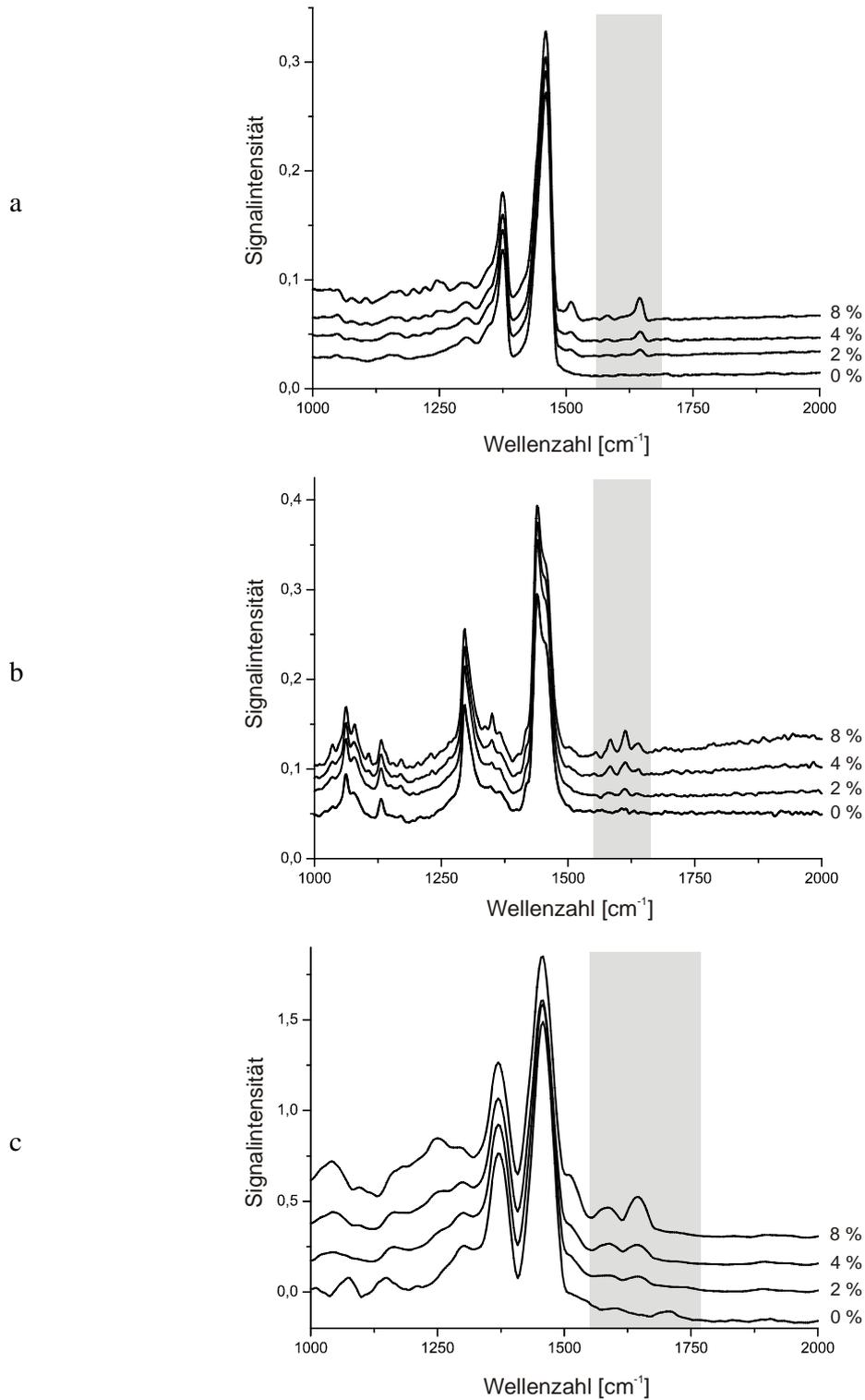


Abbildung 29: Spektrenreihen von Ketokonazol Suspensionen in verschiedenen Konzentrationen [% (m/m)] gemessen mittels a) FTIR-ATR, b) FT-Raman und c) FTIR-PAS. Die zur quantitativen Auswertung herangezogenen Spektralbereiche sind unterlegt.

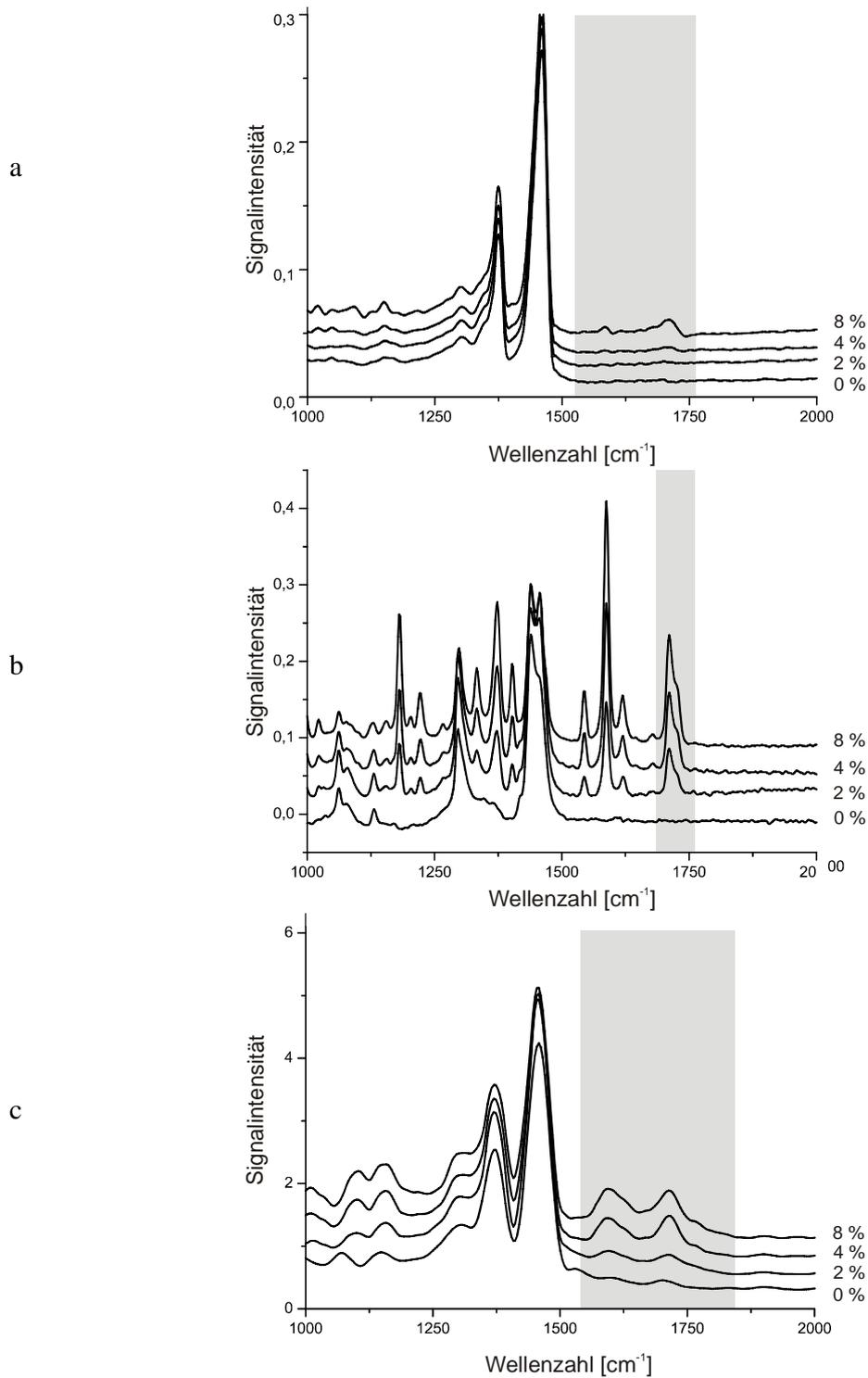


Abbildung 30: Spektrenreihen von Methoxsalen Suspensionen in verschiedenen Konzentrationen [% (m/m)] gemessen mittels a) FTIR-ATR, b) FT-Raman und c) FTIR-PAS. Die zur quantitativen Auswertung herangezogenen Spektralbereiche sind unterlegt.

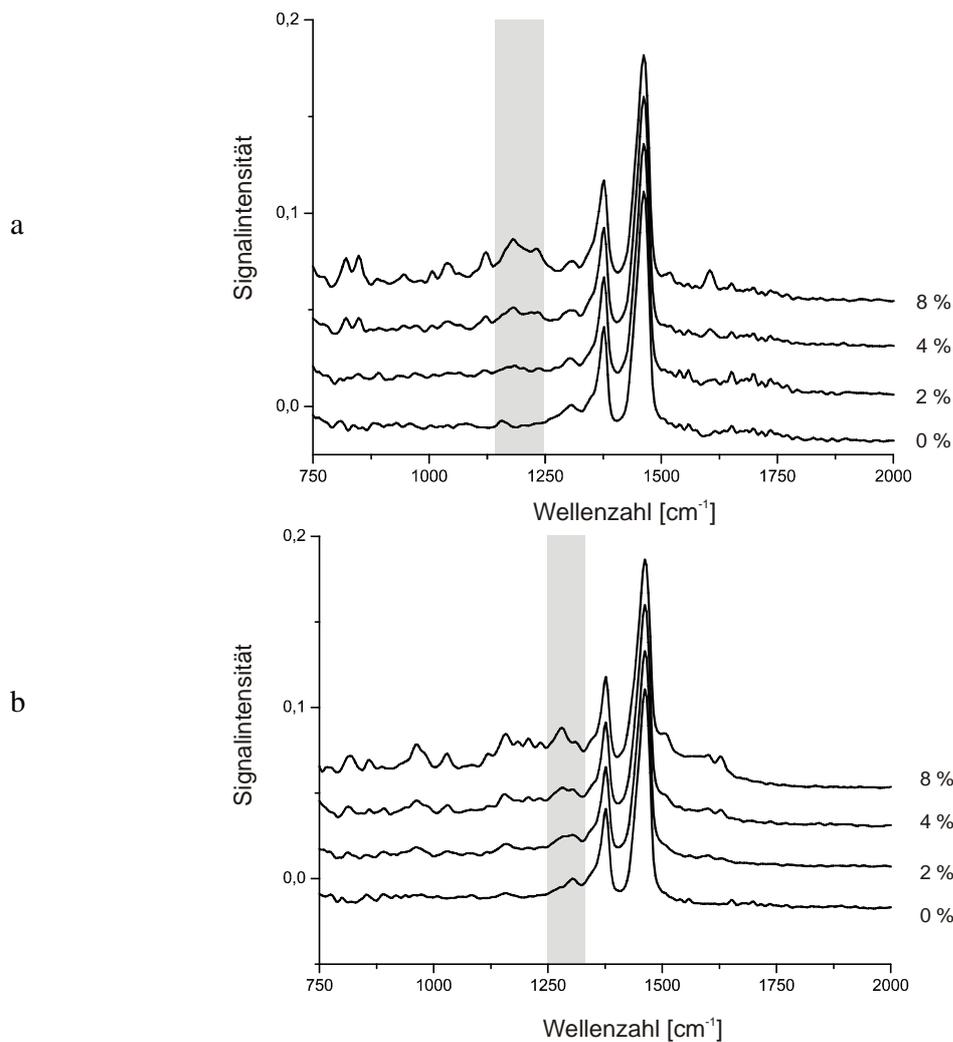


Abbildung 31: Spektrenreihen von a) Methylorange und b) Curcumin Suspensionen in Vaselinum album in verschiedenen Konzentrationen [% (m/m)] gemessen mittels FTIR-PAS.

Tabelle 8: Wiederholstandardabweichungen [% (m/m)] für die Bestimmung der Wirkstoffkonzentration von Methoxsalen (Me), Ketokonazol (Ke), Methylorange (Mo) und Curcumin (Cu) in halbfesten Suspensionen ($n \geq 5$). Als Messverfahren wurden PDS (16 Hz), FTIR-PAS (rapid scan), FT-Raman und FTIR-ATR verwendet.

Methode	Me	Ke	Mo	Cu
PDS	4,4	2,8	7,5	7,3
FTIR-PAS	3,0	1,7	2,1	2,9
FT-Raman	1,9	1,9		
FTIR-ATR	10,3	5,9		

Nachweis- und Bestimmungsgrenze geben die niedrigsten nachweisbaren bzw. die mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit quantifizierbaren Konzentrationen des Analyten an. Deren Berechnung basierte in dieser Arbeit auf den Werten für die Steigung S und den Standardfehlern der Residuen SD der Regressionsgeraden: $DL = 3,3 \cdot SD/S$ bzw. $QL = 10 \cdot SD/S$.

Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen zu Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zusammen. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 0,06 und 0,53 % (m/m) und sind damit im Vergleich zu anderen analytischen Verfahren eher hoch. Da jedoch weder ein Wirkstoff extrahiert

noch sonst irgendeine Probenvorbereitung vorgenommen werden muss, sind diese Ergebnisse wiederum sehr beachtlich. Besonders niedrige Nachweisgrenzen konnten mit der FT-Raman Spektroskopie erzielt werden. Die PDS ergab ein zweigeteiltes Bild. Die Grenzen für Nachweis und Quantifizierung sind für die Me und Ke Messungen vergleichsweise hoch. Mo und Cu Zubereitungen waren hingegen noch bei Konzentrationen $c \leq 0,08$ % (m/m) photothermisch nachweisbar und lieferten somit die besten Ergebnisse aller Methoden. Denn die reinen Formulierungen zeigten im Gegensatz zu den Wirkstoffen im sichtbaren Spektralbereich äußerst geringe Absorption, sodass für Cu und Mo eine hochselektive Anregung der Modellsubstanzen erreicht wurde. Wohingegen im verwendeten infrarot Bereich das Absorptionsverhalten der Inhaltstoffe weniger charakteristisch ausgeprägt war.

Letztlich konnten bei geringer Laserleistung ($\lambda = 532$ nm) sehr hohe PD Signalintensitäten auch bei niedrigen Konzentrationen gemessen werden. Me und Ke zeigen hingegen bei 978 cm^{-1} im Vergleich zur Grundlage nur leicht höhere Absorption als diese (Abb. 24).

Tabelle 9: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen [% (m/m)] für die Wirkstoffe bzw. Substanzen Methoxsalen (Me), Ketokonazol (Ke), Methylorange (Mo) und Curcumin (Cu) in halbfesten Suspensionen. Als Messverfahren wurden PDS (16 Hz), FTIR-PAS (rapid scan), FT-Raman und FTIR-ATR verwendet.

Methode	Me	Ke	Mo	Cu
PDS	0,37 / 1,11	0,19 / 0,57	0,06 / 0,18	0,08 / 0,24
FTIR-PAS	0,29 / 0,87	0,29 / 0,87	0,53 / 1,59	0,52 / 1,56
FT-Raman	0,06 / 0,18	0,06 / 0,18		
FTIR-ATR	0,27 / 0,81	0,14 / 0,42		

Fazit

Da zum Zeitpunkt der Studie die Möglichkeit der Punktmessung entwicklungsbedingt noch nicht gegeben war, fand die PDS im Imaging Modus Verwendung, während FTIR-PAS, -ATR und Raman Spektroskopie als Punktmessverfahren eingesetzt wurden. Aus diesem Grund ergaben sich längere Messzeiten für die PD Messungen. Verglichen mit den verwendeten Referenzmethoden, konnte die PDS hinsichtlich Parametern wie Nachweisgrenze oder Standardabweichung ähnliche Größenordnungen erreichen. Insbesondere wenn die Wellenlänge der Anregungsstrahlung und die lokalen Absorptionsmaxima sehr nahe beieinander lagen, wie dies für Mo und Cu der Fall war, zeigte die PDS eine höhere Nachweisempfindlichkeit. Weiterhin zeigte sich, dass die Anregung im sichtbaren effektiver war als im IR Bereich. Die Anwendung des IR Lasers ermöglichte die Detektion von Ke und Me, die im visuellen Spektralbereich keine erhöhte Absorption zeigen. Die mit der IR-PDS erreichte Nachweisempfindlichkeit war vergleichbar mit den Referenzmethoden. Obwohl der verwendete CO_2 -Laser den Vorteil hat, einen Wellenlängenbereich von $10,20$ μm bis $10,79$ μm abzudecken (entspricht 927 cm^{-1} bis 979 cm^{-1}) und somit für verschiedene Substanzen als Anregungsquelle in Frage kommt, stellte sich doch heraus, dass diese Art von Anregung für die Fragestellung in dieser Arbeit eher ungeeignet war. Einerseits wirkte sich die schlechtere Fokussierbarkeit negativ auf die Auflösung aus, andererseits konnte doch keine hohe Selektivität erreicht werden, da zahlreiche organische Substanzen im Wellenlängenbereich des Lasers absorbieren. Die Einstellung verschiedener Wellenzahlen erfolgt bei diesem Laser temperaturkontrolliert anhand von Lüftern, die an der Außenseite angebracht sind. Nach längerer Laufzeit, innerhalb von wenigen Stunden, erwärmte sich der Laser jedoch so stark, dass die Temperatur nicht mehr konstant gehalten werden konnte und es resultierend zu Abweichungen bei der Wellenlänge und Schwankungen der Leistung kam. Somit waren Messungen über längere Zeiträume, wie sie für die weiteren Experimente geplant waren, nicht durchführbar. Es wurde auf die Anwendung der Nd:YAG Laser gesetzt, die sich durch sehr hohe Konstanz der Ausgangsleistung auszeichnen.

4.2. Anwendung der PD Bildgebung zur Untersuchung des Stofftransports in Membranen

Die Wirksamkeit einer topischen Formulierung wird maßgeblich durch die Freisetzung des enthaltenen Wirkstoffs bestimmt. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß des Arzneistofftransports in die benachbarte Akzeptorphase, beispielsweise die humane Haut, sind sowohl durch die Freisetzung aus der Formulierung als auch durch die Eigenschaften des Akzeptors bestimmt.

Die laterale Verteilung von topisch applizierten Substanzen im Akzeptor ist ein zu der erwünschten Hautpenetration konkurrierender Prozess. Trotz der Wichtigkeit der Untersuchung solcher Verteilungsprozesse konnte bisher nur in wenigen Studien die laterale Diffusion von Wirkstoffen untersucht werden [108, 114-117]. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass klassische Verfahren den Anforderungen für derartige Messungen, wie z. B. eine hohe örtliche Auflösung, nicht gerecht werden. Zudem sind Wirkstoffkonzentrationen im Spurenbereich zu erwarten, was wiederum hohe Anforderungen an das analytische Verfahren im Hinblick auf die Nachweisempfindlichkeit stellt. In herkömmlichen Studien wird das topisch behandelte Stratum corneum mittels Tape Stripping entfernt. In definierten Distanzen zur Applikationsgrenze werden Teile des Tapes herausgeschnitten, anschließend erfolgen die Extraktion und die Quantifizierung des Wirkstoffs [111]. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, das Experiment *in vivo* durchführen zu können. Bedingt durch das Entfernen des Stratum corneum, kann pro Versuch jedoch nur ein Zeitpunkt des Diffusionsprozesses beobachtet werden. Ein weiterer Nachteil ist der große analytische Aufwand der betrieben werden muss, um eine relativ kleine Anzahl von Messpunkten zu erhalten.

Optische Messtechniken können alternativ angewendet werden. Insbesondere die Raman Mikroskopie und Methoden der IR-Mikroskopie werden seit einigen Jahren für derartige Untersuchungen herangezogen [13-16, 118-124]. Optische Techniken sind kontaktlose Messverfahren, die zahlreiche Vorteile bieten. Sie messen nicht invasiv, mit hoher örtlicher Auflösung und zum Teil tiefenaufgelöst auch unter der Oberfläche der Probe *in situ*.

Die PDS gehört zu den Methoden, die die genannten Vorteile aufweisen. Inwieweit diese Technik geeignet ist, den lateralen Stofftransport in Membranen darzustellen, soll in diesem Kapitel nachgegangen werden [125].

4.2.1. Betrachtung der lateralen Diffusion von Dithranol in einer DDC Membran

Das Penetrationsverhalten des Wirkstoffs Dithranol geht aus zwei Vorarbeiten von B.D. Hanh hervor. Laut seinen Untersuchungen ist der Diffusionskoeffizient von Di in der DDC Membran $2,31 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [86]. Hanh stellte auch einen Vorversuch zum PD Imaging an, welcher die laterale Diffusion des Arzneistoffs vermuten lässt [26]. Aufgrund seiner Ergebnisse sollten die ersten Untersuchungen an dem gleichen System erfolgen.

Die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen sollten darstellen, ob der Prozess der Diffusion von Di Molekülen in DDC Membranen mittels PDS abgebildet werden kann und ob Aussagen über die Kinetik der Diffusion abgeleitet werden können.

Visualisierung der Diffusion von DI

Zur Untersuchung der Visualisierung des Diffusionsvorganges, wurde folgender Versuch durchgeführt. Eine DDC Membran mit 4 % Dodecanol Gehalt wurde als Akzeptormembran eingesetzt. Um möglichst gute Akzeptoreigenschaften zu gewährleisten, wurde ein hoher Dodecanol Gehalt gewählt, der den eher lipophilen Eigenschaften von Di entgegenkam. Nach Methode L2b wurde ein rundes Gefäß mit einer Suspension von 5 % Di in Vaselinum album auf die Membran aufgebracht.

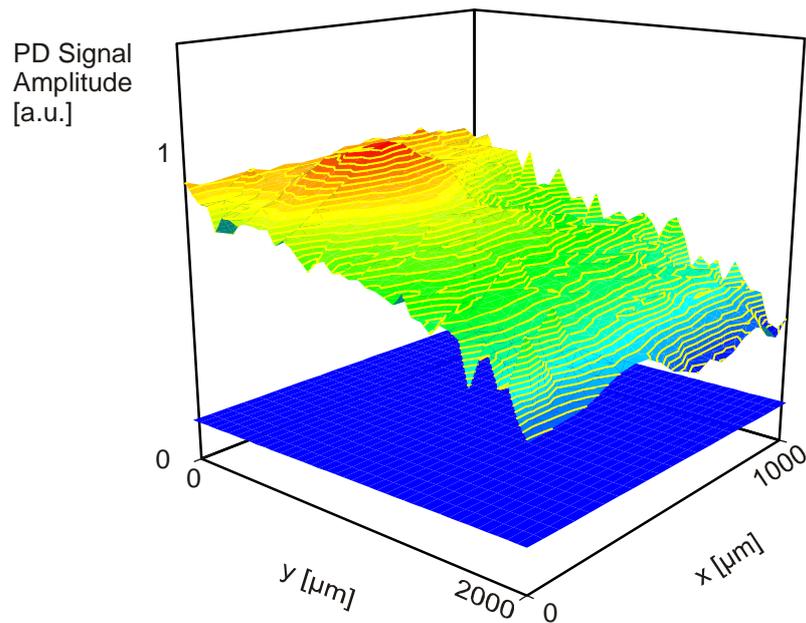


Abbildung 32:

PD Image einer DDC Membran mit Di. Die blaue Fläche zeigt das PD Signal der Messfläche zu Beginn des Versuchs (t_0). Die farbige Fläche wurde 72 h später (t_1) gemessen und repräsentiert das Konzentrationsprofil von Di in der Membran. (Methode: PDS Monobloc)

Das Volumen des Donators sollte deutlich größer sein als das Akzeptorvolumen ($V_d = 70\text{mm}^3 \gg V_a = 1,1\text{mm}^3$), um eine konstante Donatorkonzentration zu gewährleisten. Anhand des UV-Vis Spektrums des Wirkstoffs wurde der Nd:YAG Laser (532 nm) als Anregungsquelle ausgewählt (Abb. 24 b). Die Modulationsfrequenz betrug $f = 16\text{ Hz}$. Nach 72 h Kontaktzeit, wurde ein an die Grenzfläche des Behältnisses angrenzendes Messgebiet von $1 \times 2\text{ mm}^2$ gescannt (Abb. 32). Die Auflösung betrug $50\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$, so dass sich das PD Image aus 861 Messpunkten zusammensetzt. Die Scandauer betrug 10 Minuten.

Die 3D Farbdarstellung zeigt zwei Flächen, die jeweils die Amplitude des PD Signals über der Messfläche darstellen (Abb. 32). Die untere glatte Fläche repräsentiert das PD Signal der reinen DDC Membran. Es handelt sich um einen aus Einzelmessungen stammenden Mittelwert ($n = 4$; $\text{SD}_{\text{rel}} = 2\%$), der für die gesamte Fläche angenommen und zur Verdeutlichung der Signalveränderung in das Diagramm eingetragen wurde. Nach 72 h Versuchszeit zeigt sich ein deutlicher Anstieg des PD Signals. Der Verlauf ist durch einen Gradient der Amplitude des Signals in y – Richtung gekennzeichnet. Da die Amplitude des PD Signals mit der Konzentration des Analyten korreliert, kann das PD Image als ein Abbild der Konzentrationsverhältnisse in der Membran verstanden werden. Es zeigt deutlich Bereiche höherer Wirkstoffkonzentration, die sich nahe der Diffusionsgrenze befinden. Wie zu erkennen ist, nimmt mit größer werdendem Abstand zur Diffusionsgrenze die Anzahl der Di Moleküle in der Membran ab. Ein Konzentrationsgradient $\partial c_{Di}/\partial y$ wird abgebildet.

Betrachtung der Diffusionskinetik

Nachdem gezeigt wurde, dass der in der Membran bestehende Konzentrationsgradient photothermisch abbildbar ist, sollte im nächsten Schritt die zeitliche Erfassung des Diffusionsprozesses hinzukommen. Zur Betrachtung kinetischer Aspekte der Diffusion von Di in der DDC Membran wurde ein weiterführendes Experiment vorgenommen.

Hierfür wurde als Donator wurde eine Di Vaseline Suspension 5 % verwendet. Als Akzeptor fand eine DDC Membran mit 2 % Dodekanol Gehalt Verwendung, deren Volumen (V_a) im Vergleich zum Donatorvolumen (V_d) deutlich kleiner war, $V_d \gg V_a$. Die Versuchsanordnung entsprach wieder Variante L2b. Zur Erfassung dieses Prozesses wurde ein direkt an die Formulierung angrenzender Bereich von $1000 \times 850 \mu\text{m}^2$ untersucht. Die Justierung des Messgebiets erfolgte, wie in Kapitel 3.8 beschrieben, indem die Probe solange in y – Richtung verfahren wurde, bis die Formulierung den Weg des DTL blockierte, wodurch das PD Signal auf 0 V abfiel. Dieser Punkt wurde als Grenzfläche für die Diffusion angesehen. Der erste Messpunkt in y – Richtung wurde $50 \mu\text{m}$ von der Formulierung entfernt positioniert. Die Schrittweite des Tisches wurde auf $25 \mu\text{m}$ eingestellt, somit ergaben sich 1435 Messpunkte und eine Messdauer von 17 min pro Image. Um den zeitlichen Verlauf des Prozesses aufzunehmen, wurden wiederholte Flächenmessungen über 55 h durchgeführt. Nach dem Übergang des Wirkstoffs aus der Suspensionsalbe in die Akzeptormembran sollte die laterale Diffusion der Di Moleküle entsprechend des Konzentrationsgefälles erfolgen. Demzufolge waren im Messgebiet mit zunehmender Dauer des Experimentes steigende PD Signale zu erwarten. Abbildung 33 zeigt exemplarisch drei PD Images im 2D Modus. Direkt nach der Applikation der Formulierung zum Zeitpunkt t_0 ist ein konstantes PD Signal über das gesamte Messgebiet homogen verteilt (Abb. 33 a). Es entspricht dem Hintergrundsignal der Membran. Die bereits von der Formulierung freigesetzten Di Moleküle haben zu diesem Zeitpunkt die Distanz zum Messgebiet noch nicht überwunden. Die 25 Stunden nach Beginn des Experiments im gesamten Messfeld steigenden PD Signale zeigen, dass die Di Moleküle jetzt bereits eine Diffusionsschicht von mindestens $900 \mu\text{m}$ durchquert haben (Abb. 33 b). Weitere 20 Stunden später zeigt sich ein vergleichbares Bild (Abb. 33 c). Weiterhin sind steigende PD Signale zu verzeichnen. In y - Richtung liegt noch immer ein Signalgradient und demzufolge ein Konzentrationsgradient vor. Der Gleichgewichtszustand der Konzentrationsverteilung im betrachteten Membranbereich ist noch nicht erreicht.

Im unteren rechten Randbereich ist ein Spot mit deutlich höheren Signalwerten zu erkennen. An dieser Stelle war der AL zwischen zwei Messungen positioniert. Bedingt durch die Dauerbestrahlung kam es hier zu photooxidativen Prozessen. In diesem Fall fand eine Verfärbung der Membran statt, die lokal (x/y 900/50) zu einer höheren Absorption und damit zu hohen PD Signal Amplituden führte. Indem eine „Ruheposition“ für den Laser einige Millimeter vom Messbereich entfernt eingerichtet wurde, konnte Belastung der Membran deutlich reduziert werden. Dennoch kam es bedingt durch die Bestrahlung der wirkstoffhaltigen Membran auch während der Messung zu photochemischen Veränderungen des Wirkstoffs, welche zu einer erhöhten Absorption und damit zu PD Signalen führten, die nicht mit der Konzentration c_{Di} korrelierten. Somit wurden quantitative Aussagen zu dem untersuchten System nicht vorgenommen.

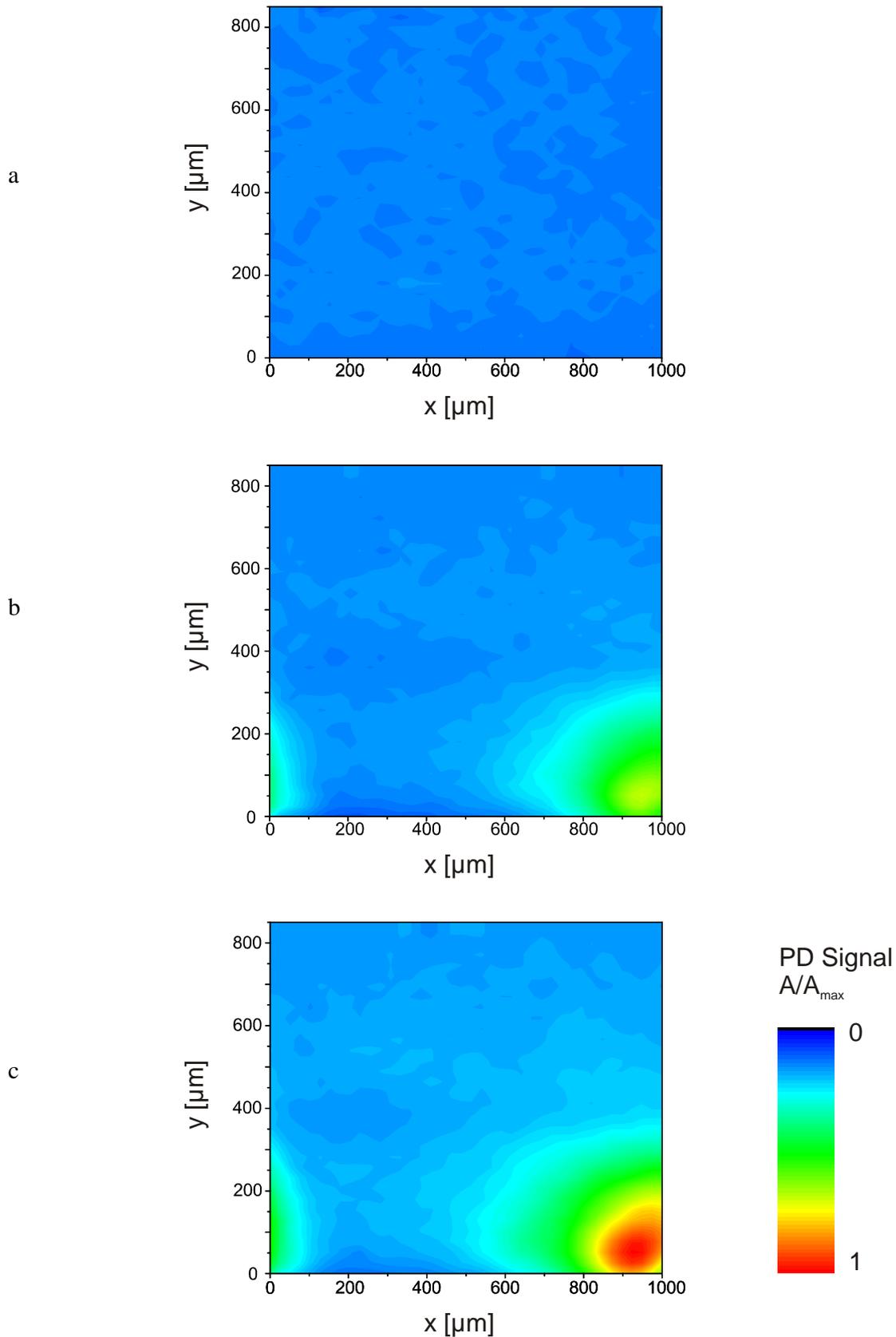


Abbildung 33:

PD Image eines Bereiches einer DDC Membran, in dem der Transport von Wirkstoffmolekülen aus einer Di Vaseline Suspension in den Messbereich stattfindet. Die Formulierung befindet sich bei $y = -50 \mu\text{m}$. Die dargestellten Messungen fanden bei $t = 0 \text{ h}$ (a); 25 h (b) und 45 h (c) statt. (Methode: PDS Monobloc)

Raman Mikroskopie

Die Anwendung einer geeigneten Referenzmethode, der Raman Mikroskopie, sollte die mittels PDS erlangten Resultate verifizieren. Zunächst erfolgte die Charakterisierung aller Komponenten des Versuchs. Bei der Grundlage der Formulierung handelte es sich um Vaselinum album. Das Raman Spektrum in Abbildung 34 zeigt eine deutliche Bande bei 1460 cm^{-1} . Hier überlagern sich die die CH_2 – und die CH_3 – Deformationsschwingungen. Des Weiteren ist die Drehschwingung der $-(\text{CH}_2)$ - Bindungen bei 1296 cm^{-1} zu erkennen. Beide Signale sind ebenfalls im Spektrum der DDC Membran vorhanden, da die gleichen strukturellen Gruppen sowohl im Dodecanol als auch im Kollodium vorkommen. Im ausgewählten Spektralbereich findet sich zwischen 800 und 900 cm^{-1} eine für die DDC Membran charakteristische Bande, wobei es sich um die CCO Streck-schwingung handelt, die in primären und sekundären Alkoholen in diesem Bereich auftritt. Sowohl Kollodium als auch Dodecanol weisen Hydroxylgruppen auf, somit sind sie Strukturmerkmale beider Komponenten der DDC Membran und tragen zu der Bande 851 cm^{-1} bei. Zusätzlich trägt auch die Nitro- Gruppe des Kollodiums zur Intensität dieser Bande bei. Aufgrund ihrer Spezifität für die DDC Membran wurde sie als Referenzbande verwendet. Der Arzneistoff Di zeigt zwischen 450 und 650 cm^{-1} mehrere deutliche Banden auf. Die molekulare Struktur von Di besteht aus einem Anthraceengerüst mit drei Hydroxylgruppen in Position 1, 8 und 9. In dem genannten Spektralbereich sind Schwingungen der Ringdeformation von kondensierten Benzenen zu beobachten [126]. Die Banden 616 cm^{-1} und 485 cm^{-1} werden dieser Art von Signalen zugeordnet und sind im gewählten System für Di spezifisch (Abb. 34). Das Spektrum einer Di enthaltenden DDC Membran zeigt neben den membrantypischen Banden auch deutlich die Ringdeformationsschwingungen des Arzneistoffs.

Um die räumliche und zeitliche Dimension der PD Messergebnisse zum Verhalten von Di zu prüfen, wurde ein zu den PD Imaging Messungen möglichst identischer Versuch mittels Raman mikroskopischer Untersuchung angestrebt. Aufgrund der messtechnischen Anordnung des Mikroskops mussten jedoch zwei Änderungen vorgenommen werden. Da die Objektive mit einem maximalen Arbeitsabstand von 1 mm zu nah an der Formulierung gewesen wären bzw. die Formulierung berührt hätten, wurde der Versuchsaufbau L2a gewählt. Des Weiteren wurde keine Fläche untersucht, sondern es wurde ein sogenannter Line Scan durchgeführt, d.h. es wurden einzelne Punkte entlang der y – Achse über eine Distanz von $2500\text{ }\mu\text{m}$ gemessen. Wiederholte Line Scans wurden über 70 Stunden durchgeführt. Bedingt durch die Versuchsanordnung drang ein Teil der Formulierung beim Auflegen der Membran zwischen diese und den Probenhalter, worauf die hohen Di Signale, die direkt nach Versuchsbeginn bereits an der Grenzfläche zur Formulierung gemessen wurden, hinweisen (Abb. 35). Trotzdem wurden die Ergebnisse für den Vergleich verwendet, da sich im weiteren Verlauf des Experiments zeigte, dass die Formulierung nicht weiter wanderte und da diese Versuche lediglich einen Überblick über das Verhalten des Wirkstoffs geben sollten. Auch die Raman Ergebnisse zeigen einen Konzentrationsgradienten $\partial c_{Di}/\partial y$ in der Membran. Mit zunehmender Dauer des Experiments nimmt dieser Gradient ab, weil die Konzentration von Di in der Membran ansteigt. Die Raman Messungen weisen ebenso wie der PD Versuch Di nach 24 h in einer Distanz von $1000\text{ }\mu\text{m}$ zur Formulierung nach. Nach 45 h steigt die Di Konzentration in der Membran weiterhin an. Ein Absinken der Di Konzentration zeigt sich nach 45 h im ersten Messpunkt ($y = 0$). Im Rahmen des Konzentrationsausgleiches steigt nicht nur die Di Konzentration im Akzeptor, sondern es nimmt auch die Arzneistoffmasse im Donator ab.

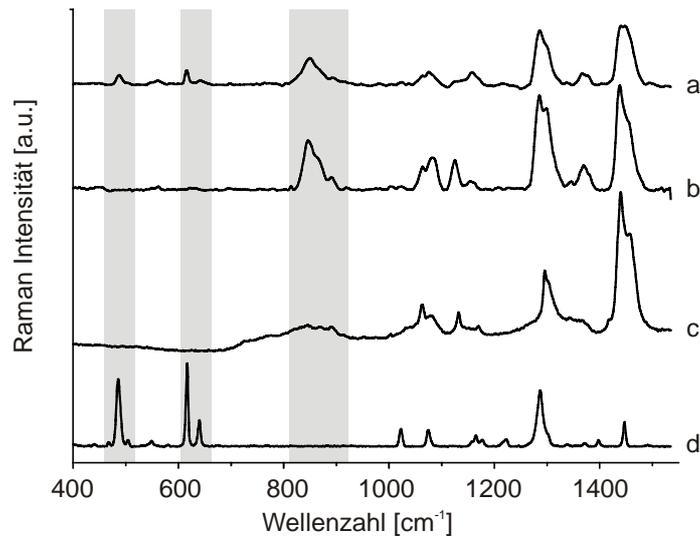


Abbildung 34:

Raman Spektren von a) DDC Membran mit Di, b) DDC Membran, c) Vaselinum album und d) Dithranol. Die Banden bei 485 cm⁻¹ und 616 cm⁻¹ sind für Di spezifisch und nicht von den anderen Komponenten überlagert. Als Bezugsbande wurde die bei 851 cm⁻¹ gelegene Schwingung herangezogen, da sie lediglich von der DDC Membran herrührt. (Methode: Raman Mikroskop)

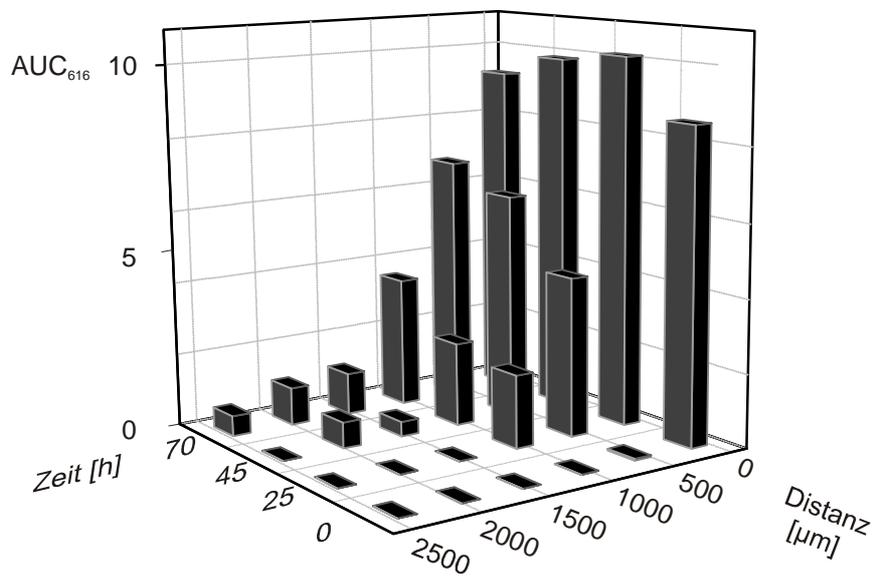


Abbildung 35: Raman Line Scan an einer DDC Membran: Integrierte Fläche der Raman Bande 616 cm⁻¹ repräsentiert die Konzentration von Di in einer DDC Membran in Abhängigkeit von Zeit und Distanz zur Formulierung. (Methode: Raman Mikroskop)

Mit Hilfe der konfokalen Raman Mikroskopie konnte ein Blick an die Grenzfläche zwischen Formulierung und Akzeptormembran geworfen werden. Oberhalb des Donators wurde das Profil der Di Konzentration in der Membran in z-Richtung gemessen (Aufbau T1). Durch das senkrechte Verschieben einer transparenten Probe im Fokus des Raman Lasers ist es möglich, ein Tiefenprofil der Zusammensetzung des Probenmaterials zu erhalten (vergl. Kap. 2.2). Die Brechungseffekte an der Grenzfläche Gasphase/ Untersuchungsobjekt wurden mittels Gleichung (40) korrigiert. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Relation von eingestellter und realer Messtiefe.

Da eine 30 μm dicke DDC Membran verwendet wurde, deckt der dritte Messpunkt bereits den Bereich der angrenzenden Formulierung ab. Abbildung 36a veranschaulicht, wie im Fortgang des Experiments der Gradient $\partial c_{Di}/\partial z$ abnimmt, die Konzentrationen in Formulierung und Membran kommen sich näher, erreichen aber nicht das gleiche Niveau. Betrachtet man lediglich den Donator (Abb. 36b), lässt sich feststellen, dass die Masse an Di zeitabhängig leicht abnimmt (P3 und P4), an anderer Stelle aber konstant bleibt (P1 und P2). Jedoch ist die Konzentration im Donator selbst nach 60 h nur an einem Punkt unter 80 % des ursprünglichen Gehalts gesunken. Somit kann von einer eher konstanten Wirkstoffkonzentration im Donator während des Versuchs ausgegangen werden.

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen eingestellter Messtiefe Δ und der realen Messtiefe nach Everall ($z_{min} - z_{max}$) und der Fokusslänge z_f .

Δ [μm]	z_{min} [μm]	z_{max} [μm]	Fokusslänge [μm]
1	1,47	2,46	0,99
10	14,65	24,6	9,95
20	29,3	49,2	19,90

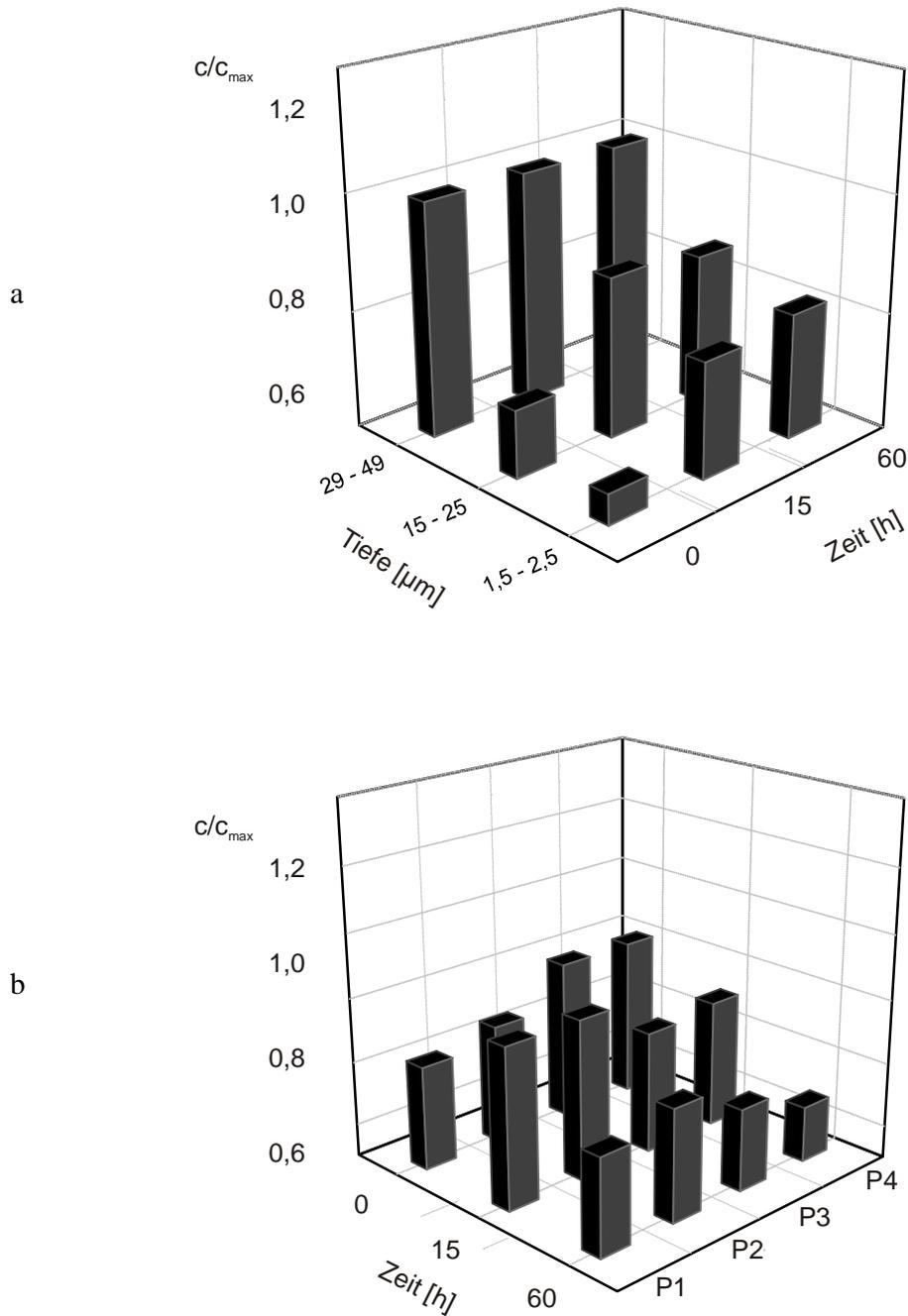


Abbildung 36:

a) Zeit- und Tiefenprofil der Konzentration von Di in einer DDC Membran bis in die angrenzende Formulierung ($n = 3$; $7,8 \% < SD_{rel} < 17,8 \%$).

b) Normierte Konzentration von Di in Abhängigkeit von der Zeit für verschiedene Messpunkte (P1 bis P4) an der Grenzfläche zwischen Donator und Akzeptor ($z_{min} - z_{max} = 29 - 49 \mu m$).

(Methode: Raman Mikroskop)

4.2.2. Untersuchung der Freisetzung von Curcumin

Neben den antikanzerogenen Wirkungen von Curcumin (Cu) [127, 128] und nachgewiesenen antioxidativen Eigenschaften in Hautzellen [129], erlangte die Substanz auch schon im Rahmen biopharmazeutischer Untersuchungen des Stofftransports in Stratum corneum und humaner Haut Relevanz [130-132]. Trotzdem handelt es sich nicht um einen klassischen Wirkstoff in der Dermatologie, eine medizinische Anwendung am Patienten erfolgte bislang nicht. Anhand des Absorptionsspektrums erkennt man, dass sich das Absorptionsmaximum von Cu mit der Wellenlänge des Anregungslasers $\lambda = 473 \text{ nm}$ überschneidet, während bei der Wellenlänge des zweiten Nd:YAG Lasers $\lambda = 532 \text{ nm}$ nur noch eine leicht erhöhte Absorption des Arzneistoffs vorhanden ist (Abb.24 b). Die Untersuchungen im Kapitel 4.1 zeigten, dass der Wirkstoff dem photothermischen Nachweis gut zugänglich ist (Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze 0,08 % bzw. 0,24 %). Basierend auf der guten Nachweisbarkeit von Curcumin sowie der Lage der Absorptionsbande im sichtbaren Spektralbereich wurde Cu neben Di als weitere Modellsubstanz zur Untersuchung der Wirkstoffpenetration herangezogen.

Cu Freisetzung

Ein Versuchsaufbau nach dem Schema L2b sollte zeigen, ob eine messbare Freisetzung von Cu aus einer Vaseline Suspension stattfindet. Eine 2% Suspension des Wirkstoffs wurde mit einer DDC Membran in Kontakt gebracht. Die Formulierung wurde in einem PAS Probengefäß so auf die Membran gesetzt, dass die Suspension eine kreisrunde Kontaktfläche mit der Akzeptormembran hatte. Nach 72 h wurde die Suspension entfernt und die Membran vorsichtig mit einem Wattebausch gereinigt.

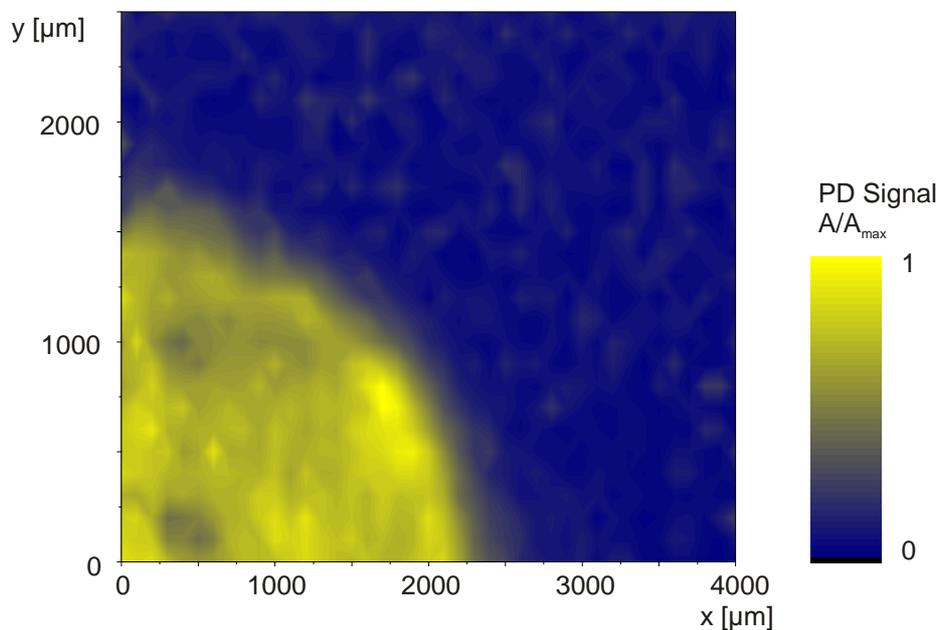


Abbildung 37:

PD Image eines Ausschnitts einer DDC Membran, welche freigesetztes Curcumin enthält. Die Bereiche hoher Signalintensität zeigen das Vorhandensein des Wirkstoffs an. (Methode: PDS Monobloc)

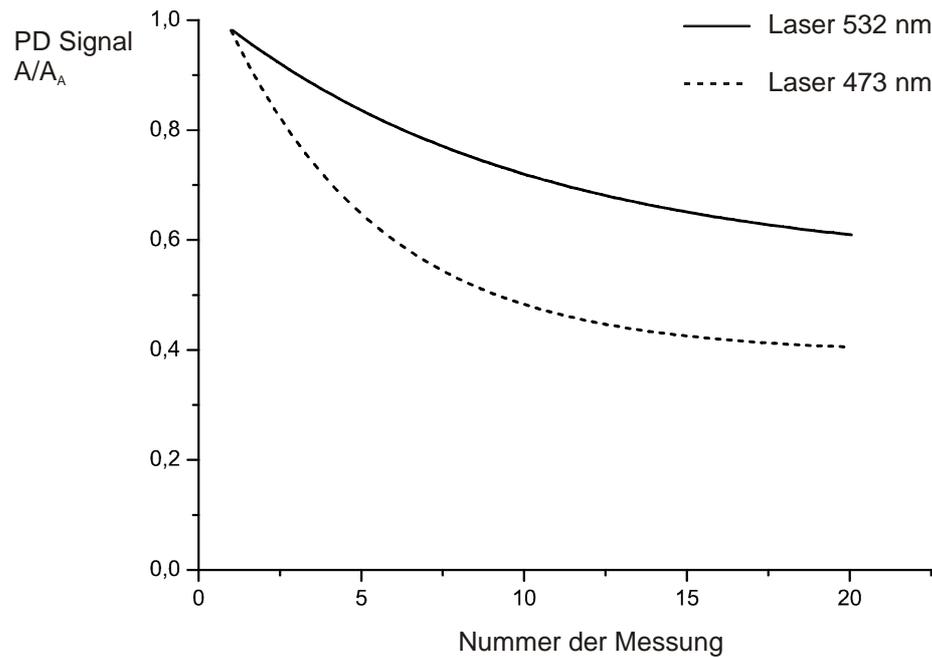


Abbildung 38:

Vergleich des Verlaufs der Amplitude des PD Signals während einer Dauermessung an Cu enthaltenden Membranen mit zwei Anregungslasern. (Methode: PDS Monobloc)

Anschließend erfolgte die Messung über ein Gebiet von $2500 \times 4000 \mu\text{m}^2$, welches sowohl den direkten Kontaktbereich von Donator und Akzeptor umfasste, als auch das angrenzende Membrangebiet. Das resultierende PD Image besteht aus 1066 Bildpunkten (Abb. 37). Die Anregungsstrahlung des Nd:YAG Lasers ($\lambda = 473\text{nm}$) wurde mit einer Frequenz von 16 Hz moduliert. Die Leistung der Laserstrahlung auf der Probe betrug 10 mW. Die Messdauer ergab 20 Minuten. Deutlich ist im linken unteren Bereich ausgehend von den Koordinaten (x;y 0;0) ca. ein Viertel des Kontaktbereichs zu erkennen. Die Konzentration von Cu in diesem Teil der Membran sind ausreichend für die Erzeugung messbarer Signale. Eine Freisetzung des Modellstoffs aus der Formulierung sowie dessen Penetration in die Membran sind erfolgt. Außerhalb der vorherigen Kontaktfläche fallen die PD Signale schnell auf das Grundsignal herab.

Einen Einblick in die Kinetik der Freisetzung von Cu aus der genannten Formulierung ist durch die wiederholte Betrachtung des gleichen Messgebiets während eines Versuchs möglich. Das Eindringen der Wirkstoffmoleküle in die Membran sollte sukzessive zu einer erhöhten Absorption und damit zu einem zeitabhängigen Anstieg des PD Signals führen.

Zunächst zeigte sich jedoch bei der Durchführung von wiederholten Messungen an Cu enthaltenden Proben eine Signalabnahme. Dies trat insbesondere bei der Verwendung der Anregungslinie $\lambda = 473 \text{ nm}$ auf. Curcumin gehört zu den sogenannten nicht lichtechten Substanzen, welche unter Lichteinfluss und bei gleichzeitigem Sauerstoffkontakt photochemische Reaktionen eingehen. Sind dabei Chromophore betroffen, können sich die Absorptionsmaxima des Moleküls verschieben. In Abbildung 38 ist der Verlauf der PD Signalamplitude während einer Dauermessung an einer DDC Membranen dargestellt. Die Membranen wurden vorher 72 h mit einer 2 % Cu Vaseline Suspension in Kontakt gebracht, die anschließend von der Oberfläche entfernt wurde. Jeweils 20 Flächenmessungen wurden mit den Nd:YAG Lasern $\lambda = 473 \text{ nm}$ und $\lambda = 532 \text{ nm}$ durchgeführt. Aus den Amplitudenwerten der Images wurden die Mittelwerte gebildet, so dass sich pro Messung ein Wert ergab, welcher gegen die Nummer der Messung aufgetragen in Abbildung 38 dargestellt ist. Die Messwerte zeigen das Verhalten einer Abbaureaktion, deren Verlauf einer Expo-

nentialfunktionen der Form $A = A_E + k * \exp(-M / b)$ folgt (Abb. 38). A_E ist der Endwert der Funktion, M ist die Nummer der Messung und k sowie b kennzeichnen die Steigung. Der abnehmende Signalverlauf zeigt, dass durch die Bestrahlung mit beiden Laserwellenlängen ein photochemischer Abbau der Chromophore von Cu auftritt. Die deutlich stärkere Signalabnahme und damit der ausgeprägte Bleicheffekt war nach der Bestrahlung bei der Wellenlänge $\lambda = 473$ nm festzustellen. Aufgrund der nicht gegebenen Lichteinheit von Curcumin konnten somit keine Aussagen über tatsächliche Konzentrationen des Wirkstoffs getroffen werden. Trotzdem war es durch die Anwendung des Nd:YAG mit $\lambda = 532$ nm und durch Normierung der Messergebnisse möglich, Tendenzen zur Freisetzung und Diffusion von Curcumin in der DDC Membran zu untersuchen. Jede Flächenmessung wurde einer Min Max Normierung unterzogen, so dass laterale Signalveränderungen weiterhin erkennbar blieben.

Cu Penetration

Zunächst sollte die Penetration von Cu in die Akzeptormembran *in situ* betrachtet werden. Als Formulierung wurde wieder eine 2 % Suspension aus Cu in Vaseline verwendet. Eine DDC Membran (der Dicke $L = 25 \mu\text{m}$) diente als Akzeptor. Das System wurde im Versuchsaufbau T2 mit der Anregungswellenlänge $\lambda = 532$ nm untersucht. Ein Membrangebiet von $1000 \times 500 \mu\text{m}^2$ wurde photothermisch wiederholt über 72 h gescannt. Abbildung 39 enthält PD Images des untersuchten Messbereichs zu den Zeitpunkten $t = 0$ h; 24 h und 72 h. Die Bilder der Flächenmessung zeigen, dass die Amplitude des photothermischen Signals zeitabhängig ansteigt. Da die Membrandicke zwischen 20 und 30 μm liegt und die thermische Diffusionslänge in der Membran bei einer Modulationsfrequenz $f = 16$ Hz etwa 44 μm beträgt, ist zunächst die Absorption der Anregungsstrahlung in der Formulierung ausschlaggebend für das PD Signal. Die thermische Welle wandert von der Grenzfläche zwischen Suspension und Membran noch durch diese hindurch bis zur Grenzfläche zur benachbarten Gasphase (Luft) und wird dabei stark abgeschwächt. Mit zunehmender Cu Konzentration in der Membran steigt dort die Absorption und somit konzentrationsabhängig das PD Signal. Die Mittelwerte der PD Amplitude der Flächenmessungen zeitabhängig aufgetragen (Abb. 39 d), verdeutlichen einen kontinuierlichen Signalanstieg über die gesamte Versuchsdauer. Ein Abflachen der Kurve oder gar eine Signalabnahme mit zunehmender Dauer sind nicht erkennbar. Die Penetration der Cu Moleküle in die Membran hält über 72 h an. Anzeichen für eine Verlangsamung des Prozesses sind nicht erkennbar. Wie man in den PD Images erkennen kann, erfolgt der Anstieg des Signals nicht großflächig homogen, sondern eher punktuell. Dies deutet darauf hin, dass die Penetration ausgehend von Kontaktpunkten einzelner Cu Partikel der Suspension mit der DDC Membran stattfindet.

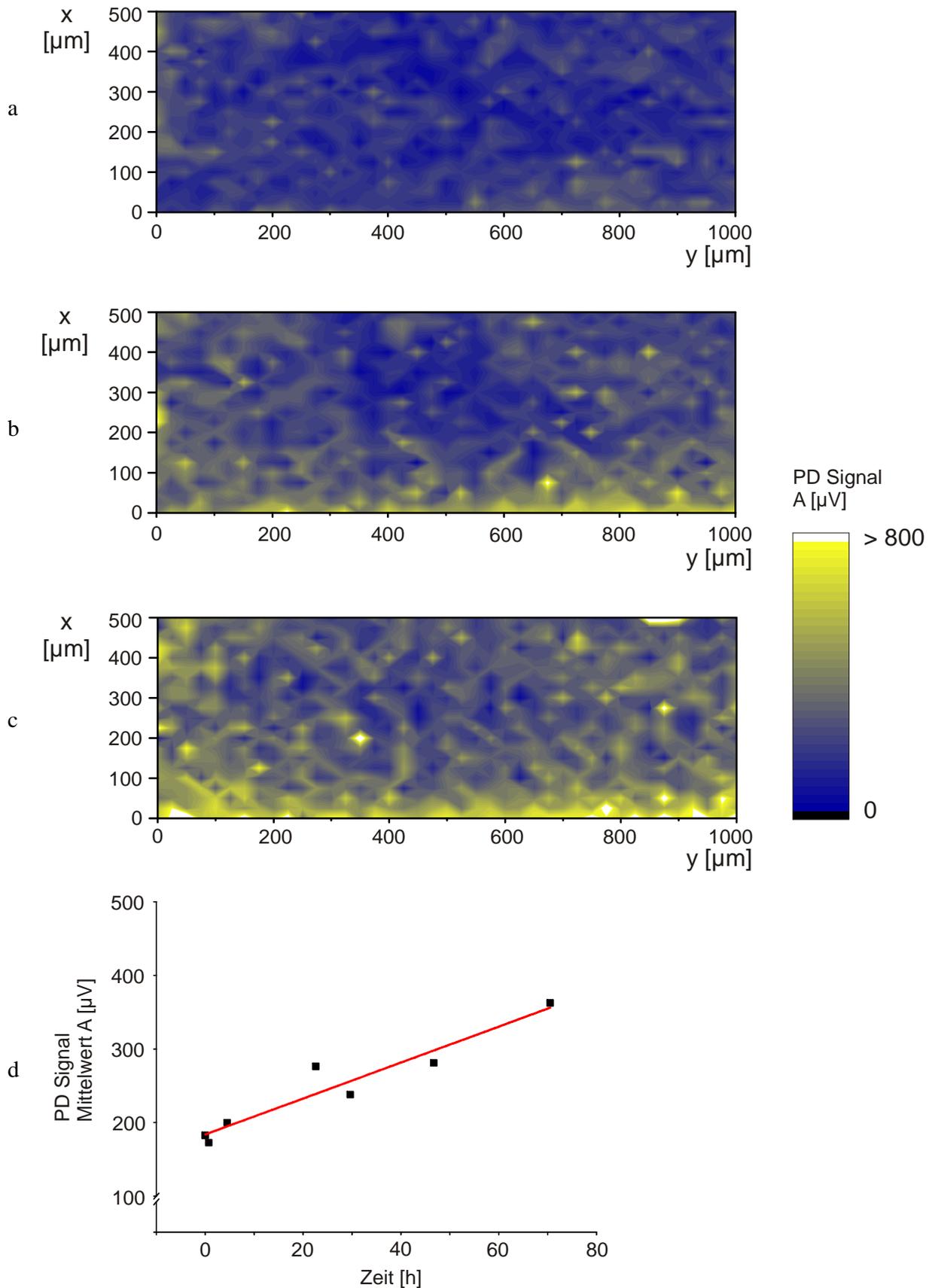


Abbildung 39:

Flächenmessungen einer DDC Membran mit darunter befindlicher Cu Suspension (2 % in Vaselinum album) nach a) 0 Stunden, b) 24 Stunden und c) 72 Stunden aufgenommen.

d) Mittelwert der Amplitudenwerte A gegen die Zeit t aufgetragen. Das steigende PD Signal zeigt eine Zunahme der Cu Konzentration in der DDC Membran an. (Methode: PDS Monobloc)

Laterale Diffusion von Cu

Mit den gleichen Komponenten und dem Versuchsaufbau nach L2a konnte das Verhalten des Wirkstoff auch in lateraler Ausrichtung in der Membran untersucht werden. Wird der Messbereich beim PD Imaging nach T2 so gewählt, dass dieser nur zum Teil von der Formulierung unterlegt ist, wird die Grenze zwischen Formulierung und Probenhalter sowohl in der Amplitude des PD Signals abgebildet, als auch im Verlauf der Phase sichtbar (Abb. 40). Während die Amplitude besonders von den optischen Eigenschaften der Probe abhängt, ist die Phase des Signals sensitiv für die Änderung von thermischen Gegebenheiten. Unterhalb der DDC Membran kann der Übergang zwischen der Formulierung und der Unterlage aus Aluminium anhand der Phasenveränderung des PD Signals deshalb exakter abgelesen werden als mit Hilfe der Amplitude, da sich deren Intensität konzentrationsabhängig ändern würde. Die laterale Diffusion von Cu in der DDC Membran unter Verwendung von Vaselinum album als Vehikel konnte anhand von Imaging Messungen nicht erkannt werden.

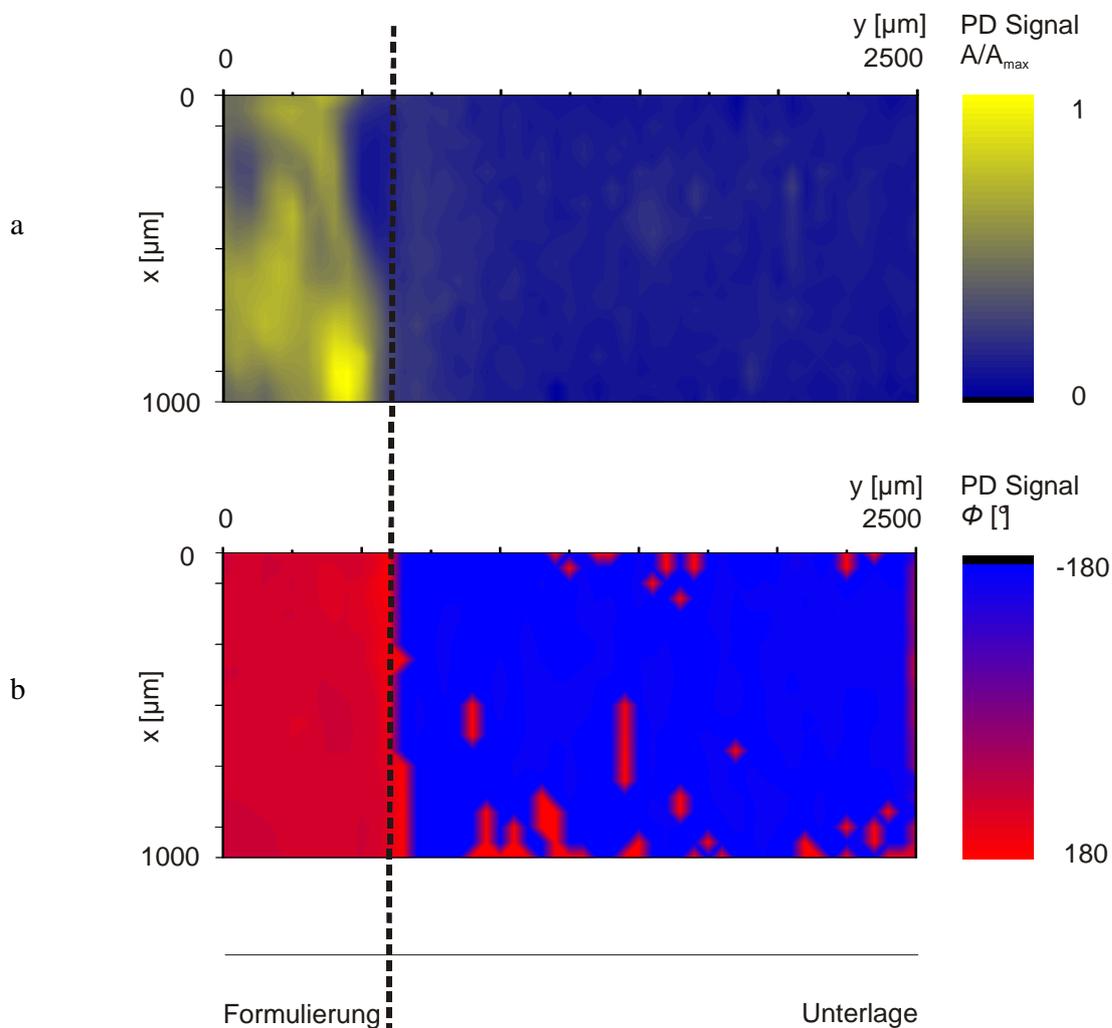


Abbildung 40:

PD Imaging der Amplitude a) und der Phase b) des PD Signals einer DDC Membran. Die Amplitude sowie die Phase des Signals zeigen an, wo die Grenzlinie zwischen der darunter befindlichen Formulierung und der Unterlage verläuft. (Methode: PDS Monobloc)

Zahlreiche Messreihen, erbrachten dieses Ergebnis. Auch die Erhöhung des Wirkstoffanteils in der Suspension oder die Variation der Dodecanol- Konzentration in der Akzeptormembran führten zu diesem Resultat.

Durch den Zusatz von 10 % Propylenglykol zur Vaseline Suspension gelang es schließlich, einen lateralen Transport von Cu zu erzeugen und photothermisch abzubilden. Abbildung 41 zeigt vier Flächenmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten des Diffusionsprozesses. Die Grenze zwischen Probenhalter und Formulierung wurde nach Kapitel 3.8 bestimmt und entspricht der x- Achse (Abb. 40). Die Imaging Messungen zeigen eine Zunahme des Signals A/A_{max} in der Membran, die auf Cu Moleküle aus der Formulierung zurückzuführen ist. Um einen Vergleich zum Signalverlauf in der DDC Membran nach Freisetzung aus beiden Formulierungen zu bekommen, wurden die Daten der Imaging Messungen gemittelt und anschließend an eine Exponentialfunktion der Form $A = A_e + k \exp(-y/b)$ angepasst ($0,87 < R^2 < 0,92$) (Abb. 42), wobei k sowie b Komponenten des Anstiegs der Funktion sind. Der Parameter b kennzeichnet die Distanz, bei der $A/A_{max} = 0,5$ ist. Der Kurvenverlauf veranschaulicht den Konzentrationsgradienten in dem untersuchten Membranbereich für die Freisetzung aus der Vaseline Suspension und für die Freisetzung aus der mit Propylenglykol versetzten Vaseline Formulierung. Das Konzentrationsprofil nach Freisetzung aus der Vaseline Formulierung zeigt keine systematische Veränderung, welche auf einen Konzentrationsanstieg in der Membran hinweisen würde. Durch die Verwendung des Enhancers ist eine zeitabhängige stetige Veränderung im Kurvenverlauf erkennbar, welche einem Konzentrationsanstieg in der Membran entspricht.

Fazit

Die Ergebnisse aus den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2 zeigen, dass der Imaging Modus der PDS verwendet werden kann, um die laterale Diffusion von Arzneistoffen in Membranen zu untersuchen. Die zeitaufgelöste bildgebende Darstellung der Konzentrationszunahme erlaubt neue Einblicke in das Diffusionsverhalten und die Freisetzung von Wirkstoffen. Dies konnte anhand des Stofftransports der Substanzen Dithranol und Curcumin aus suspensionsartigen Formulierungen in lipophile DDC Membranen demonstriert werden. Die Penetration von Cu aus einer Vaseline Suspension konnte als sehr langsamer Prozess sichtbar gemacht werden. Die laterale Diffusion des Wirkstoffs für dieses System war hingegen nicht nachweisbar. Durch den Zusatz von Propylenglykol gelang es, die Freisetzung von Cu aus einer Suspensionsformulierung so zu erhöhen, dass dessen laterale Diffusion mittels PD Imaging messbar wurde. Durch die Anregung der ausgewählten Arzneistoffe mit Lasern im visuellen Bereich kam es allerdings zu photochemischen Reaktionen, wodurch sich deren Absorptionsverhalten veränderte und eine direkte Korrelation von PD Signal und Konzentration nicht vorlag. Im Fall von Di führte dies zu einer übermäßigen Verstärkung des Signals. Cu dagegen unterlag einer "Bleichung". Mittels Normierung konnten die Werte von aufeinander folgenden Messungen verglichen werden. Die Verwendung von Anregungsquellen, deren Wellenlänge im Vergleich zum Absorptionsmaximum des Analyten verschoben ist, konnte den photochemischen Abbau reduzieren,

Die Raman Mikroskopie konnte erfolgreich als Referenzmethode eingesetzt werden, deren Ergebnisse das laterale Diffusionsverhalten von Di bestätigten. Der konfokale Modus wurde verwendet, um den Bereich der Grenzfläche zwischen Formulierung und Membran hinsichtlich der Wirkstoffkonzentration zu charakterisieren. Dabei wurde eine Zunahme der Di Masse in der Membran oberhalb der Formulierung registriert, die gemessene Konzentration in der Suspension blieb jedoch stabil. Die mittels Raman Mikroskop eingestellte Messposition weicht mit größer werdender Messtiefe zunehmend von der wahren Messposition ab, wodurch sich die Tiefenauflösung verschlechtert.

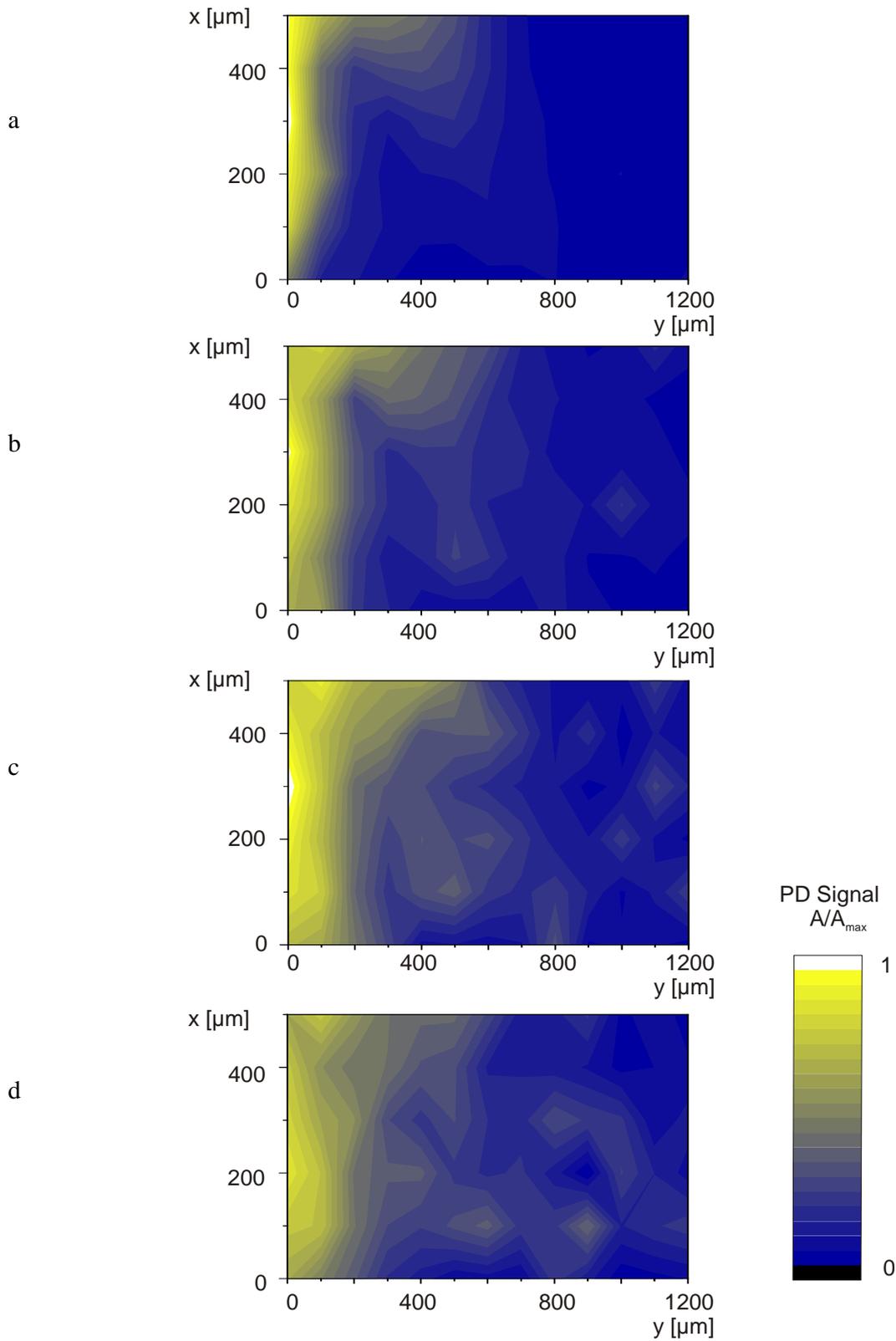


Abbildung 41:

PD Imaging der lateralen Diffusion von Cu in einer DDC Membran nach Freisetzung aus einer Suspension aus Vaselinum album mit Zusatz von 10 % Propylenglykol. Die Messungen erfolgten nach a) 0 h, b) 10 h, c) 25 h und d) 45 h. (Methode: PDS Monobloc)

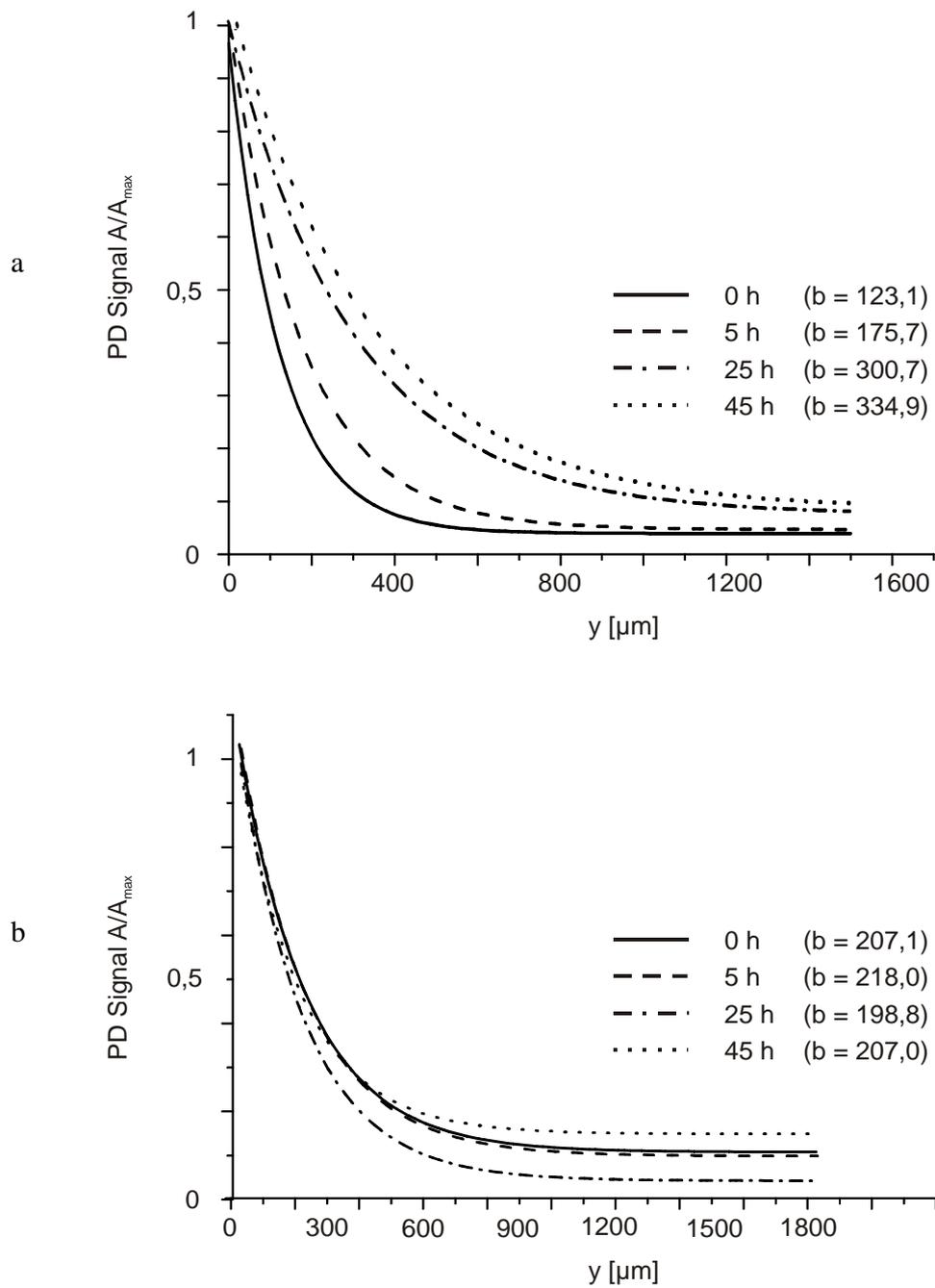


Abbildung 42:
 Konzentrationsprofile von Cu in einer DDC Membran nach Freisetzung aus a) Vaselinum album mit 10 % Propylenglykol b) Vaselinum album. Die experimentellen Messdaten wurden an eine Exponentialfunktion angepasst. Der Parameter b gibt an, bei welcher Distanz $A/A_{\max} = 0,5$. (Methode: PDS Monobloc)

4.3. Bestimmung des Diffusionskoeffizienten in DDC Membranen

Die Verwendung der photothermischen Ablenkungsspektroskopie als Flächenmessverfahren stellt eine beeindruckende Möglichkeit dar, Transportprozesse in Membranen abzubilden. Um einen Überblick über das Ausmaß und auch die Geschwindigkeit solcher Abläufe zu bekommen, kann PD Imaging herangezogen werden. Aufgrund der hohen räumlichen Auflösung sowie der ausgeprägten Sensitivität, kann das PDS Verfahren ebenso verwendet werden, um die Kinetik der mittels Imaging abgebildeten Transportprozesse zu ermitteln. Anhand des Versuchs zur Bestimmung des lateralen Diffusionskoeffizienten von Dithranol in DDC Membranen soll dies im Folgenden für die PDS demonstriert und mit der Raman Mikroskopie verglichen werden.

Wie bereits im Kapitel 3.8.2 beschrieben, wurden wiederholte Punktmessungen in definiertem Abstand l_D zur Diffusionsgrenze vorgenommen. Die in die Messzone eindiffundierenden Di Moleküle sollten in Abhängigkeit von der Dicke der Diffusionsschicht l_D nach einer definierten Zeit Δt zum Anstieg des PD Signals führen. Die Zeitspanne Δt bis zur Signalzunahme wird im Folgenden als t_{lag} bezeichnet. Als Diffusionsschichtdicken wurden Distanzen von $l_D = 1000, 2000$ und $2500 \mu\text{m}$ gewählt. Eine exemplarische Messung ist in Abbildung 43 dargestellt. Dort verläuft die Amplitude des PD Signals zunächst konstant auf niedrigem Niveau, bis nach etwa 500 Minuten ein Anstieg des Signals erfolgt (Abb. 43 a). Hier hat Konzentration der Di Moleküle in der Membran den Schwellenwert erreicht, bei dem eine Ablenkung des DTL messbar wird. Bei höheren Frequenzen ist der Anstieg des Signals flacher. Oberhalb einer Frequenz von $f = 50 \text{ Hz}$ ist eine Signalzunahme nicht mehr auszumachen. Die Messung endet nach 2200 Minuten, die Signalkurve flacht ab, ein Gleichgewichtszustand deutet sich an. Der Verlauf der Phase des PD Signals (Abb. 43 b) zeigt bis etwa 500 Minuten ein starkes Rauschen. Denn aufgrund der niedrigen Amplitude, ist auch die Phase nicht bestimmbar. Parallel zur Zunahme der Amplitude entsteht dann auch das Phasensignal. Der konstante Verlauf indiziert, dass sich die thermischen Eigenschaften im Messbereich nicht verändern. Bei hohen Frequenzen $f > 50 \text{ Hz}$ ist aufgrund der niedrigen Amplitudenwerte auch das Phasensignal nur noch als Rauschen messbar.

Ein identischer Versuch wurde mit dem Raman Mikroskop Senterra durchgeführt. Zunächst wurde unter Verwendung der für Di spezifischen Raman Bande 616 cm^{-1} eine Kalibrierung mit wirkstoffhaltigen Membranen erstellt, so dass ein Konzentrationsbereich von $1 \mu\text{g}/\text{mg}$ bis $25 \mu\text{g}/\text{mg}$ (Masse Di pro Masse Membran) abgedeckt werden konnte ($R^2 0,992$). Anhand von Punktmessungen mit dem Raman Mikroskop in definiertem Abstand l zur Diffusionsgrenze und Anpassung der Messdaten an eine Exponentialfunktion der Form

$$c = k \exp(t/b) + c_E . \quad (58)$$

wurden Konzentrations-Zeit Profile erhalten (Abb. 44). Wobei c_E die Konzentration am Ende des Prozesses darstellt und k sowie b Komponenten des Anstiegs der Funktion sind. Die Korrelation der Messdaten mit der Funktion war gegeben, fiel jedoch bedingt durch die hohe Streuung der Messwerte mit $0,95 < R^2 < 0,97$ niedrig aus. Generell zeigen die Raman Versuche, dass die Konzentrationszunahme in der Membran einem Invasionsprozess 1. Ordnung folgt. Nach etwa 500 Minuten erreicht die Di Konzentration in der Membran den kalibrierten Messbereich. Anhand des Parameters c_E war es möglich eine Aussage über die maximale Konzentration von Di c_{max} in der DDC Membran am Ende des Prozesses zu treffen. Die Konzentration in der DDC Membran wurde für verschiedene Diffusionsschichtdicken bestimmt und betrug $c_{max} = 7,97 \pm 1,39 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($n = 5$). Ebenso wie im Raman Experiment folgen die Konzentrations- Zeit- Kurven der PD Messungen einer Exponentialfunktion, jedoch ist am Beginn des Prozesses deutlich eine Verzögerungszeit t_{lag} ablesbar, welche mittels der Raman Messungen nicht zu identifizieren war.

Der Versuch der mathematischen Anpassung der gesamten Kurve, die einen sigmoiden Verlauf aufweist, brachte die größte Deckung mit der Logistik Funktion der Form:

$$A = \frac{A_A - A_E}{1 + (t/t_{1/2})^b} + A_E \quad (59)$$

Die Logistik Funktion kann zur Beschreibung von Wachstumsprozessen verwendet werden. Bei den Parametern A_A und A_E handelt es sich um den Start und den Endwert der Funktion und b ist maßgeblich für den Anstieg. $t_{1/2}$ ist die Zeit am Wendepunkt und entspricht damit dem Zeitpunkt an dem das halbmaximale Signal bzw. die halbmaximale Konzentration erreicht ist. Die Korrelation der Messergebnisse mit der Logistik Funktion lag im Bereich von $0,965 < R^2 < 0,995$ (Abb. 45). Wie zu erwarten, nimmt $t_{1/2}$ mit zunehmender Diffusionsschichtdicke zu, während sich die Standardabweichung gegensätzlich verhält (Tab. 11). Sd_{rel} wird mit größer werdender Schichtdicke deutlich kleiner, da experimentell bedingte Schwankungen der Freisetzung oder bei der Einstellung des Diffusionsweges durch die größere Schichtdicke ausgeglichen werden. A_E steht als Endwert der PD Signal Amplitude für die Di Konzentration in der Membran nach Einstellung des Gleichgewichts. Der Wert für A_E pendelt um $3000 \mu V$ und ist unabhängig von der Entfernung zur Diffusionsgrenze (Tab. 11).

Die Logistik Funktion zeigte für den gesamten Kurvenverlauf zwar die beste Korrelation, zur Ermittlung von t_{lag} erwies sich jedoch die Anpassung des ansteigenden Teils der Messdaten an eine exponentiell wachsende Funktion (wie Gleichung (58)) als geeignet (Abb. 46). Die Korrelation von Messdaten und Exponentialfunktion war gegeben ($0,92 < R^2 < 0,99$).

Die Bestimmung von t_{lag} erfolgte anhand des Schnittpunktes der Funktion mit der t - Achse für die Frequenzen 15; 20; 25 und 30 Hz. Abbildung 47 veranschaulicht, dass die Veränderung der Frequenz der Anregungsstrahlung keinen Einfluss auf die Bestimmung von t_{lag} hat. Den hingegen maßgeblichen Einfluss der Dicke der Diffusionsschicht auf t_{lag} illustriert Abbildung 48. Die für die PD Messungen ermittelte Verzögerungszeit für den Diffusionsweg von $2000 \mu m$ beträgt $t_{lag} = 447 \text{ min}$, was vergleichbar mit dem Ergebnis der Raman Messung (Abb. 44) ist. Dort erreichen die Konzentrationswerte den kalibrierten Bereich nach etwa 500 min. Dennoch variierte hier diese Zeitspanne zu sehr, um mittels Raman Messungen eine aussagekräftige t_{lag} ermitteln zu können.

Für die PD Ergebnisse konnte aus t_{lag} und den zugehörigen Schichtdicken l_D mittels Gleichung (47) der Diffusionskoeffizient für Di in der DDC Membran bestimmt werden. Für die 4 % DDC Membran ergab sich $D_{lat} = 26,2 \times 10^{-8} \pm 1,9 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. Der Diffusionskoeffizient in der 2 % DDC Membran war $D_{lat} = 2,4 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ (siehe Tabelle 12 bzw. Tabelle 13).

Auch Hanh untersuchte die Diffusion von Di in DDC Membranen [86]. Er ermittelte einen um den Faktor 10 niedrigeren Wert für den Diffusionskoeffizienten einer 2% DDC Membran ($D = 1,36 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $2,3 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$). Allerdings wurde nicht die laterale sondern die normale Diffusion des Wirkstoffs untersucht, wodurch Hanh's Wert nur bedingt als Vergleichsgröße angesehen werden kann. Denn es ist fraglich, inwieweit ein isotroper Aufbau der DDC Membran angenommen werden kann. Während ein Molekül bei der normalen Diffusion durch das Colloidum Netzwerk gelangen muss, kann es lateral an der Oberfläche möglicherweise weniger behindert in einem Lipidfilm diffundieren. Durch die Erhöhung des Anteils des eigentlichen Akzeptormediums Dodecanol in der Membran konnte dieser Effekt noch verstärkt werden. Die ermittelten Werte für D lassen auf einen solchen Zusammenhang schließen.

Zur generellen Einordnung der ermittelten Werte können die Untersuchungen von Johnson et al. für die laterale Diffusion von fluoreszierenden Substanzen in Modell Lipid Membranen herangezogen werden. Er ermittelte Werte für D zwischen 3×10^{-9} bis $1,6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ [109].

Tabelle 11: Mittels PDS ermittelte Werte für $t_{1/2}$ und A_E für verschiedene Diffusionsschichtdicken in der 4% DDC Membranen.

Diffusionsschichtdicke l_D [μm]	1000 μm	2000 μm	2500 μm
$t_{1/2}$ [min]	255,05 \pm 72,80	995,47 \pm 93,03	1919,67 \pm 53,72
A_E [μV]	2725 \pm 377	3500 \pm 557	3000 \pm 401

Tabelle 12:

t_{lag} und D für die Diffusion von Di in 4% DDC Membranen bestimmt mittels PD Punktmessungen für verschiedene Diffusionsschichtdicken l . Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für $n = 3$ bestimmt.

Modulationsfrequenz [Hz]	t_{lag} [min] ($l = 1000 \mu\text{m}$)	t_{lag} [min] ($l = 2000 \mu\text{m}$)	t_{lag} [min] ($l = 2500 \mu\text{m}$)
15	95,8 \pm 24,0	452,0 \pm 22,9	750
20	95,5 \pm 12,3	452,3 \pm 14,6	685
25	96,3 \pm 33,5	435,3 \pm 38,4	655
30	102,3 \pm 12,5	449,7 \pm 16,4	635
Mittelwert t_{lag} [min]	97,5 \pm 2,8	447,3 \pm 7,1	681,3 \pm 43,5
D [cm^2s^{-1}]	28,5 $\times 10^{-8}$	24,8 $\times 10^{-8}$	25,5 $\times 10^{-8}$

Tabelle 13:

t_{lag} und D für die Diffusion von Di in 2% DDC Membranen bestimmt mittels PD Punktmessungen.

Modulationsfrequenz [Hz]	t_{lag} [min] ($l = 500 \mu\text{m}$)
15	294,6
20	294,3
25	288,3
30	284,8
Mittelwert t_{lag} [min]	290,5 \pm 4,8
D [cm^2s^{-1}]	2,4 $\times 10^{-8}$

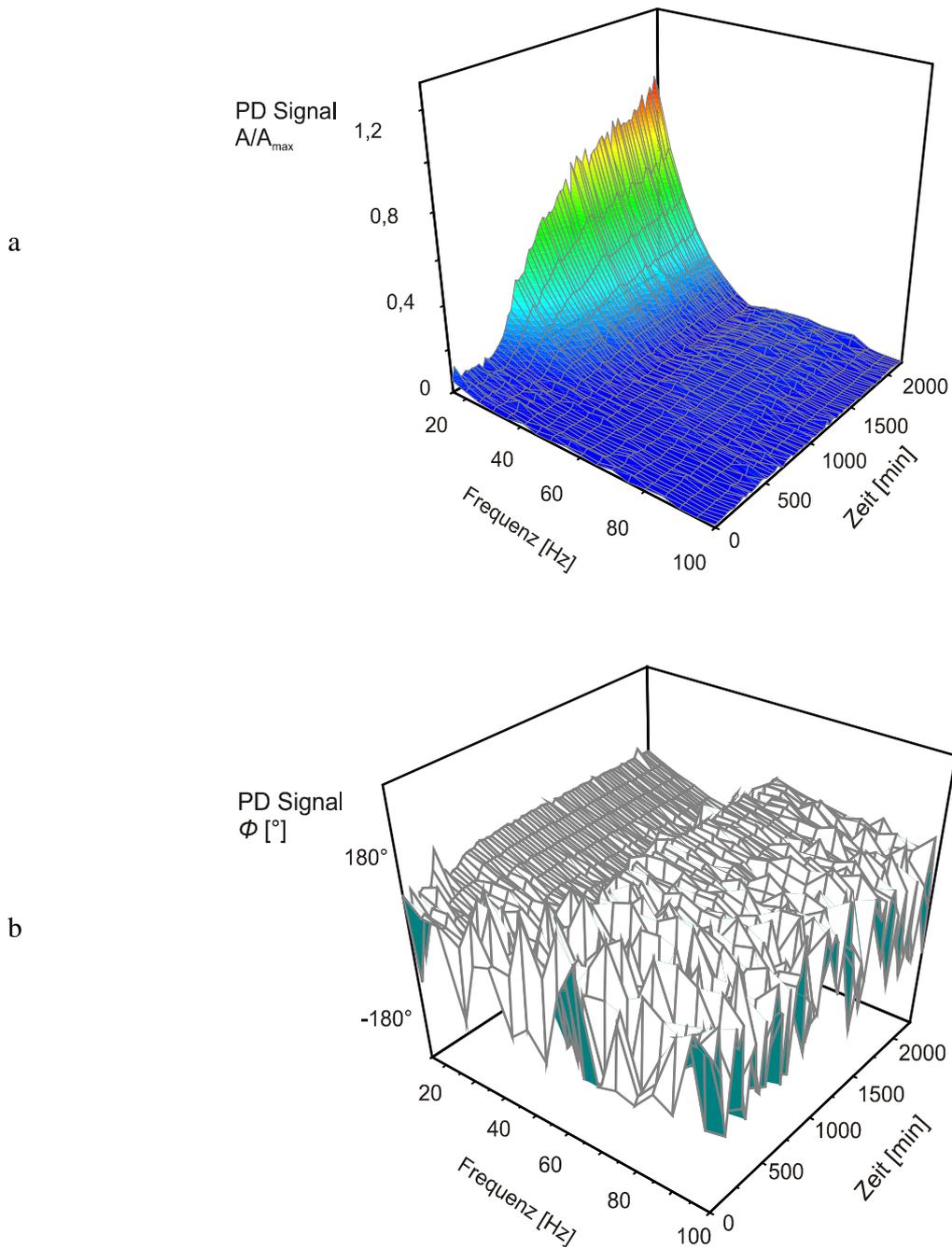


Abbildung 43:
 Amplitude (a) und Phase (b) des PD Signals einer Punktmessung an einer DDC Membran im Diffusionsversuch mit D_i in Abhängigkeit von der Zeit und der Modulationsfrequenz des Anregungslasers. Die Distanz l zur Diffusionsgrenze s beträgt $2000 \mu\text{m}$.
 (Methode: PDS Monobloc)

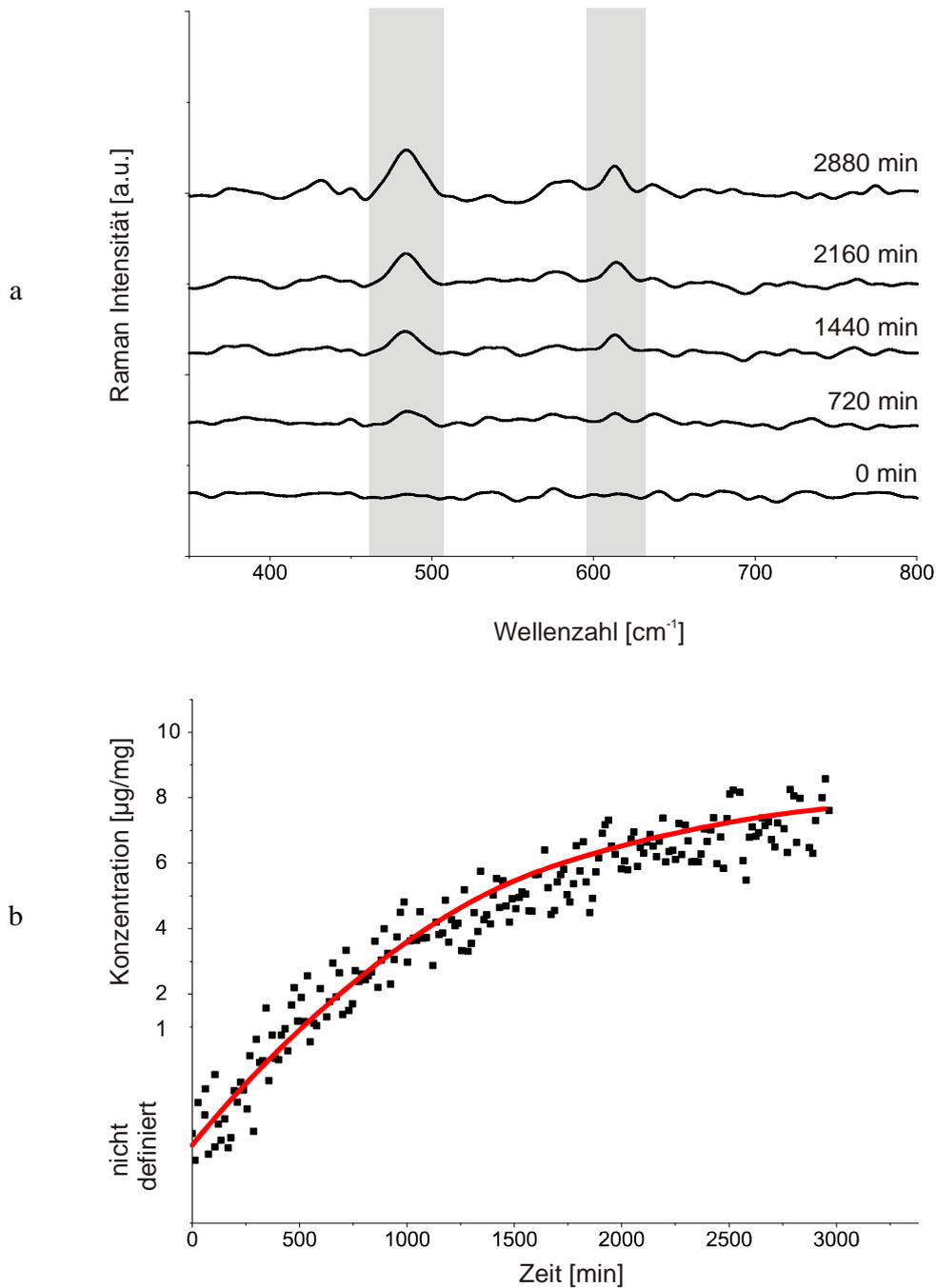


Abbildung 44:

- Differenzspektren der Raman Messungen der DDC Membran (Abstand zur Diffusionsgrenze $l = 2000 \mu\text{m}$). Die für Di spezifischen Banden 481 cm^{-1} und 616 cm^{-1} sind grau unterlegt.
- Konzentrationsprofil mit angepasster Exponentialfunktion für Di in der DDC Membran ($l = 2000 \mu\text{m}$). Bis etwa 500 Minuten sind die gemessenen Werte noch außerhalb des kalibrierten Bereichs. (Methode: Raman Mikroskopie)

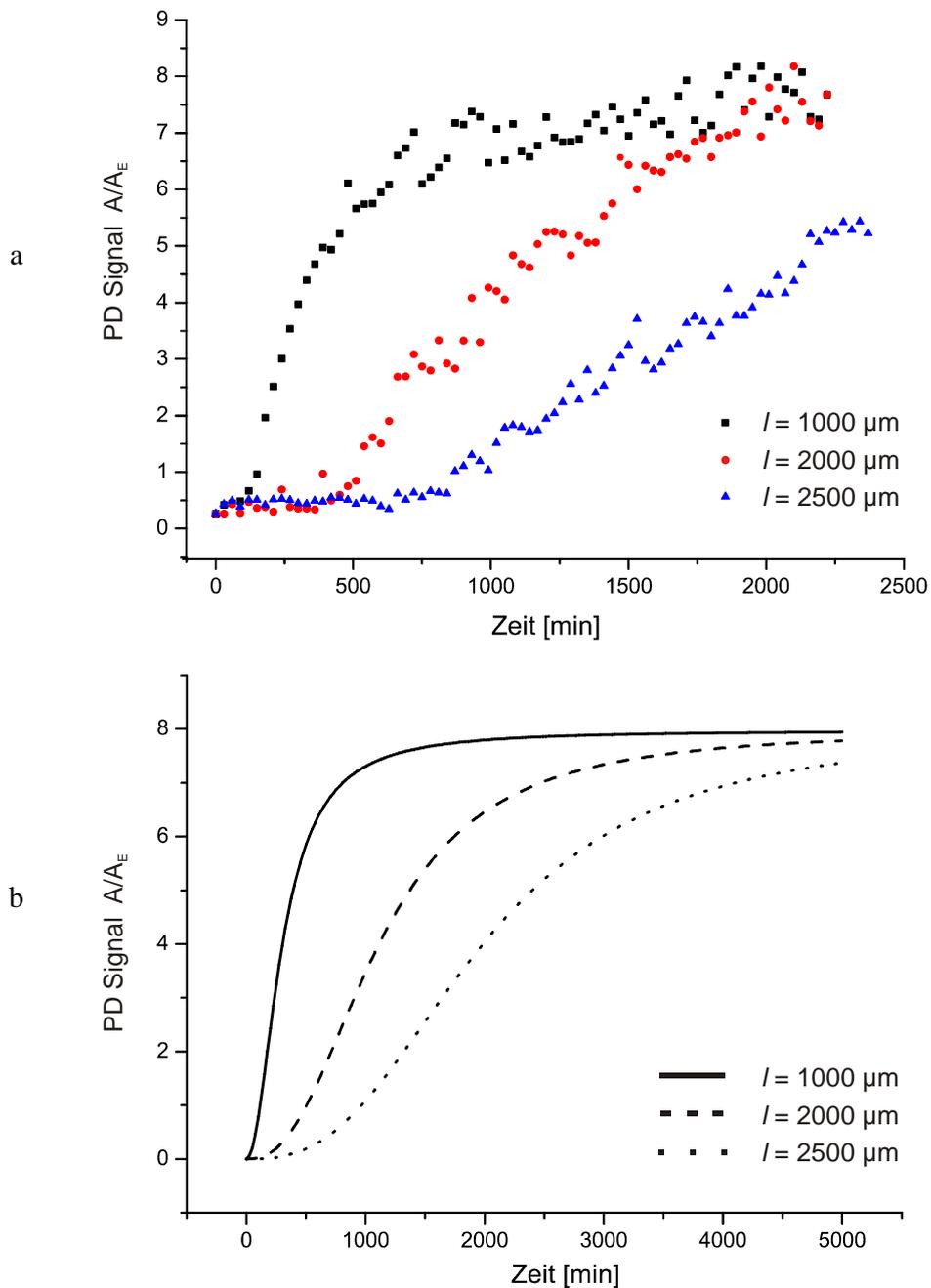


Abbildung 45:

a) Verlauf des PD Signals (A/A_E) zeigt die Konzentration von DI in der DDC Membran in Abhängigkeit von der Zeit ($f = 15 \text{ Hz}$). Es wurde drei Entfernungen l zur Diffusionsgrenze betrachtet.

b) An die Messdaten angepasste Logistik Funktionen.

(Methode: PDS Monobloc)

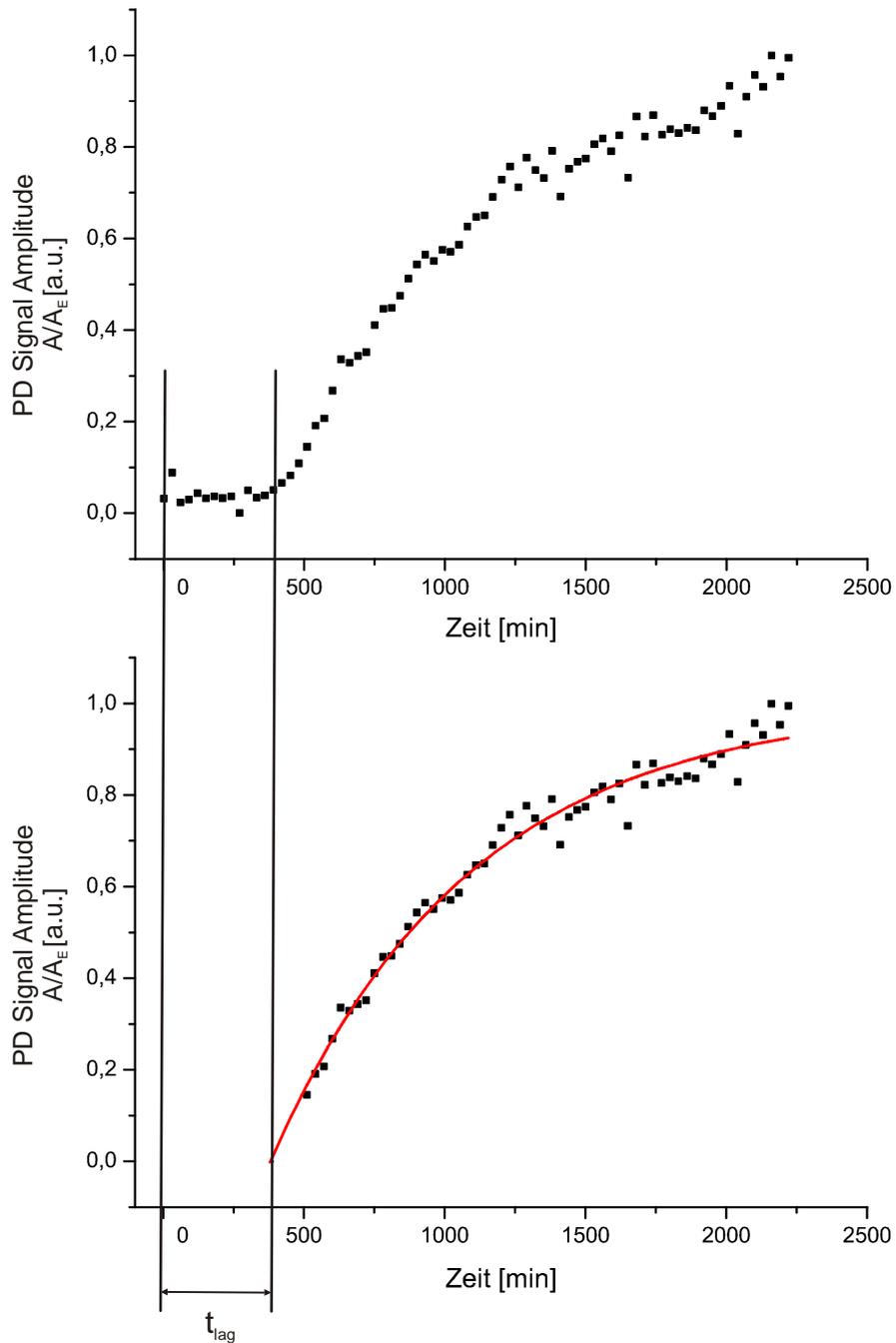


Abbildung 46:

Ermittlung von t_{lag} erfolgte durch mathematische Anpassung des aufsteigenden Kurvenastes an eine Exponentialfunktion. Der Nulldurchgang der Funktion mit der Zeit Achse wurde als t_{lag} definiert.

(Methode: PDS Monobloc)

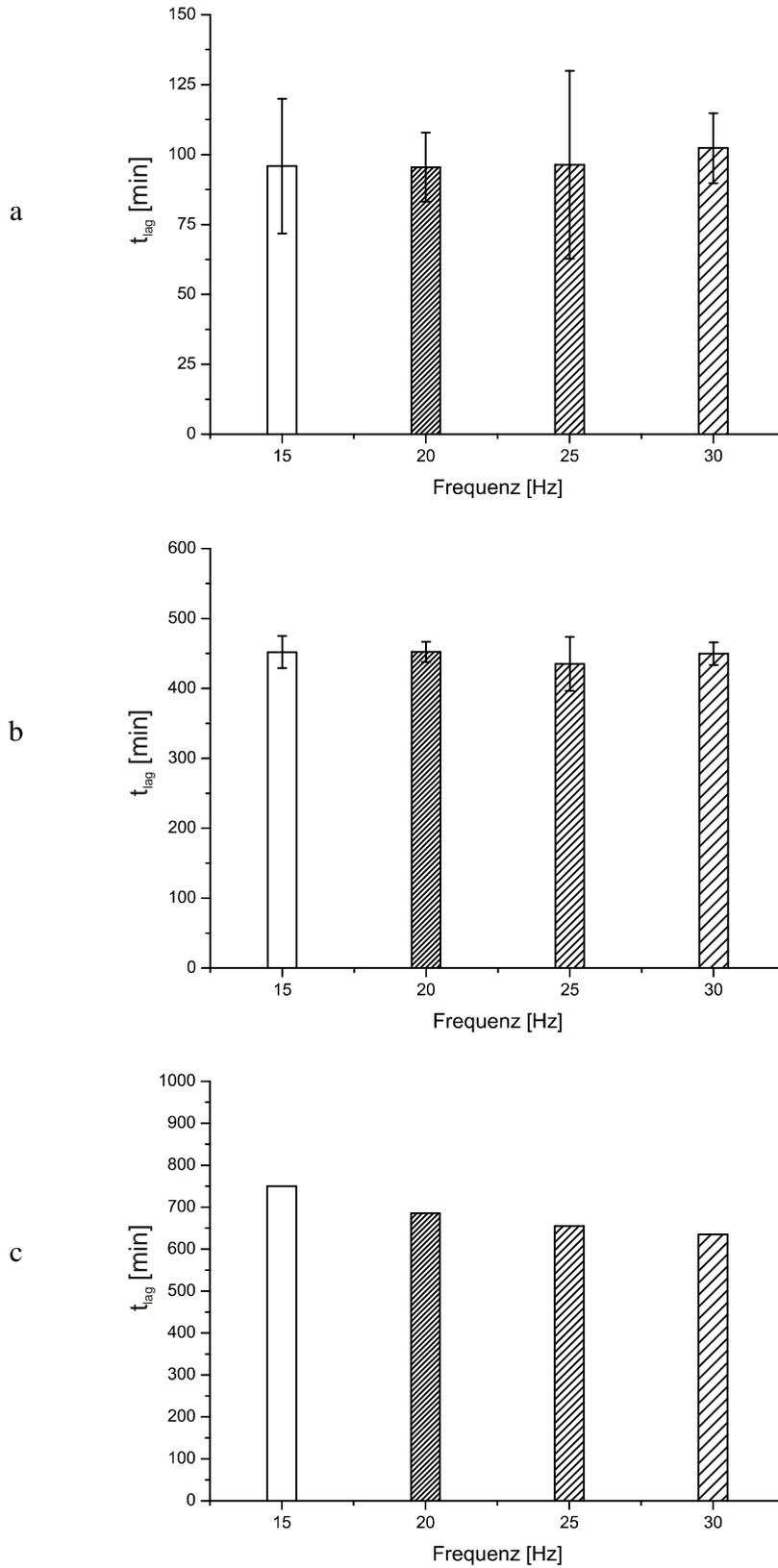


Abbildung 47:

t_{lag} in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz der Anregungsstrahlung dargestellt für die Diffusionsschichtdicken a) $l = 1000 \mu\text{m}$, b) $l = 2000 \mu\text{m}$ und c) $l = 2500 \mu\text{m}$.

(Methode: PDS Monobloc)

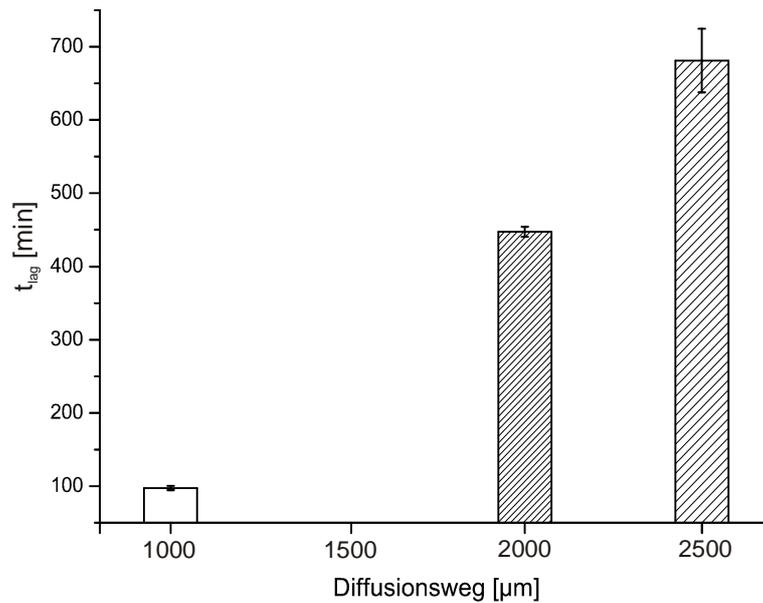


Abbildung 48:
 t_{lag} in Abhängigkeit von der Schichtdicke l der Diffusionsschicht. (Methode: PDS Monobloc)

Fazit

Die PD Punktmessung stellt eine sehr präzise Möglichkeit der photothermischen Charakterisierung dar und ergänzt somit den Imaging Modus, der eher einen Überblick über die Oberflächeneigenschaften einer Probe gewährt. Durch kurze gezielte Messungen an bestimmten Koordinaten nimmt außerdem die Bestrahlungszeit des Materials deutlich ab, wodurch auch lichtempfindliche Substanzen analysiert werden können. Die Verschiebung der Anregungswellenlänge von 532 nm zu 473 nm führte zu einer besseren Korrelation der Konzentration D_i mit dem PD Signal, so dass die Signal-Zeit-Kurven auch als Konzentrations- Zeit-Verläufe angesehen werden können. Die Zeit t_{lag} , die der Wirkstoff zur Überwindung der Diffusionsschicht l benötigt, war aus den PD Ergebnissen sehr deutlich ablesbar. Anhand vergleichbarer Messungen mit dem Raman Mikroskop konnte t_{lag} lediglich grob abgeschätzt werden. Durch Verwendung der Gleichung (47) war es möglich, den lateralen Diffusionskoeffizienten D für D_i in DDC Membranen aus den erhaltenen Werten für t_{lag} und dem Diffusionsweg l mit guter Reproduzierbarkeit abzuschätzen. Die Verdopplung des Lipidanteils in der DDC Membran hatte einen um den Faktor 10 erhöhten Diffusionskoeffizienten zur Folge. Ergänzende quantitative Information zum untersuchten System erbrachte die Anwendung der Raman Mikroskopie, indem die Gleichgewichtskonzentration von D_i in der DDC Membran gemessen werden konnte.

4.4. Thermische Diffusivität von Rinderhuf

Die thermische Diffusivität α wurde anhand von zwei Messverfahren der photothermischen Ablenkung und mittels der als Referenzmethode eingesetzten Laser Flash Technik für Rinderhuf untersucht. Beide PD Verfahren basieren auf dem sogenannten Zero Crossing, bei dem der Detektionslaser durch die thermische Linse bewegt wird und die Amplitude sowie die Phase des PD Signals in Abhängigkeit von der Position y_t registriert werden. Anhand der so erhaltenen Messdaten wurde zunächst die Bestimmung der Zero Crossing Distanz y_{zc} durchgeführt (Kapitel 3.6.1).

Um den Weg zwischen den beiden ersten nichtzentralen Nulldurchgängen des Realteils des Ablenkungssignals $\text{Re}(\text{PD})$ zu ermitteln, musste zunächst der Verlauf des Phasensignals korrigiert werden. Ein typisches Ergebnis der Korrektur ist in Abbildung 49 a zu sehen. Die korrigierten Werte zeigen den Phasensprung von +1 nach -1. Von diesem Punkt ausgehend sollte der Verlauf des Phasensignals auf beiden Seiten die Abszisse schneiden. Die Distanz zwischen beiden Schnittpunkten entspricht y_{zc} . Jedoch war für den Normalfall das Phasensignal $\text{Re}(\text{PD})$ im Bereich seiner Nullstellen so stark verrauscht, dass mittels dieser Vorgehensweise eindeutige Schnittpunkte nicht zu identifizieren waren (Abb. 49 b). Messreihen wurden für den Frequenzbereich von 5 bis 100 Hz durchgeführt, doch war die Ermittlung von y_{zc} und α_{Huf} nicht reproduzierbar. In zeitgleichen Arbeiten fand diese Prozedur schon erfolgreich Anwendung, so konnte α für Kupfer, Silizium oder Keramikschwämme bestimmt werden [133, 134]. Da die Temperaturleitfähigkeiten dieser Materialien um mindestens den Faktor 10 größer sind, ist davon auszugehen, dass die vergleichsweise niedrige thermische Diffusivität des Rinderhufs limitierend für die Anwendung dieser Methode ist.

Die alternative Vorgehensweise nach Kapitel 3.6.2. verwendet den natürlichen Logarithmus der Amplitude A des PD Signals (Abb 50 a). In der Auftragung $\ln(A)$ gegen y_t kann der tangentielle Anstieg m der Amplitude unter Verwendung von Gleichung (56) ausgewertet werden (Abb. 50 b). Es wurden mehrere Zero Crossing Messreihen ($n = 4$) unter Variation der Messstelle für die Frequenzen $f = 5; 7; 9;$ und 13 Hz durchgeführt. Die für die lineare Regression verwendeten Amplitudenbereiche wurden manuell so festgelegt, dass ein möglichst großer Bereich der Amplitude genutzt wurde (Abb. 50 b). Die resultierenden Geraden zeigen eine gute Korrelation mit den Messdaten ($0,980 < R^2 < 0,997$). Die aus dem Anstieg m erhaltenen Werte für α sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Werte für α reichen von $1,59$ bis $3,68 \times 10^{-7} \text{m}^2/\text{s}$, wobei eine Zunahme der Temperaturleitfähigkeit mit steigender Frequenz erkennbar ist. Ebenso zeigt sich eine Erhöhung der Standardabweichung mit ansteigender Frequenz. Diese Frequenzabhängigkeit ist in der Literatur nicht explizit beschrieben, jedoch gilt der beschriebene Zusammenhang laut Salazar für den Idealfall, dass der senkrechte Versatz des DTL zu vernachlässigen ist ($z_n = 0$) [98]. In der praktischen Durchführung ist dieser Fall mittels der Skimming Methode nicht realisierbar. Untersuchungen werden deshalb im niedrigen Frequenzbereich vorgenommen, da die Bedingungen hier dem Idealfall am nächsten kommen. Der Vergleich mit der Referenzmethode zeigt, dass die bei 5 Hz ermittelte Temperaturleitfähigkeit am besten mit dem Wert der Laser Flash Methode korreliert. Literaturangaben zur thermischen Diffusivität vergleichbarer Materialien bzw. Gewebe sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die ermittelte Temperaturleitfähigkeit von Rinderhuf kommt der humaner Nägel erwartungsgemäß am nächsten.

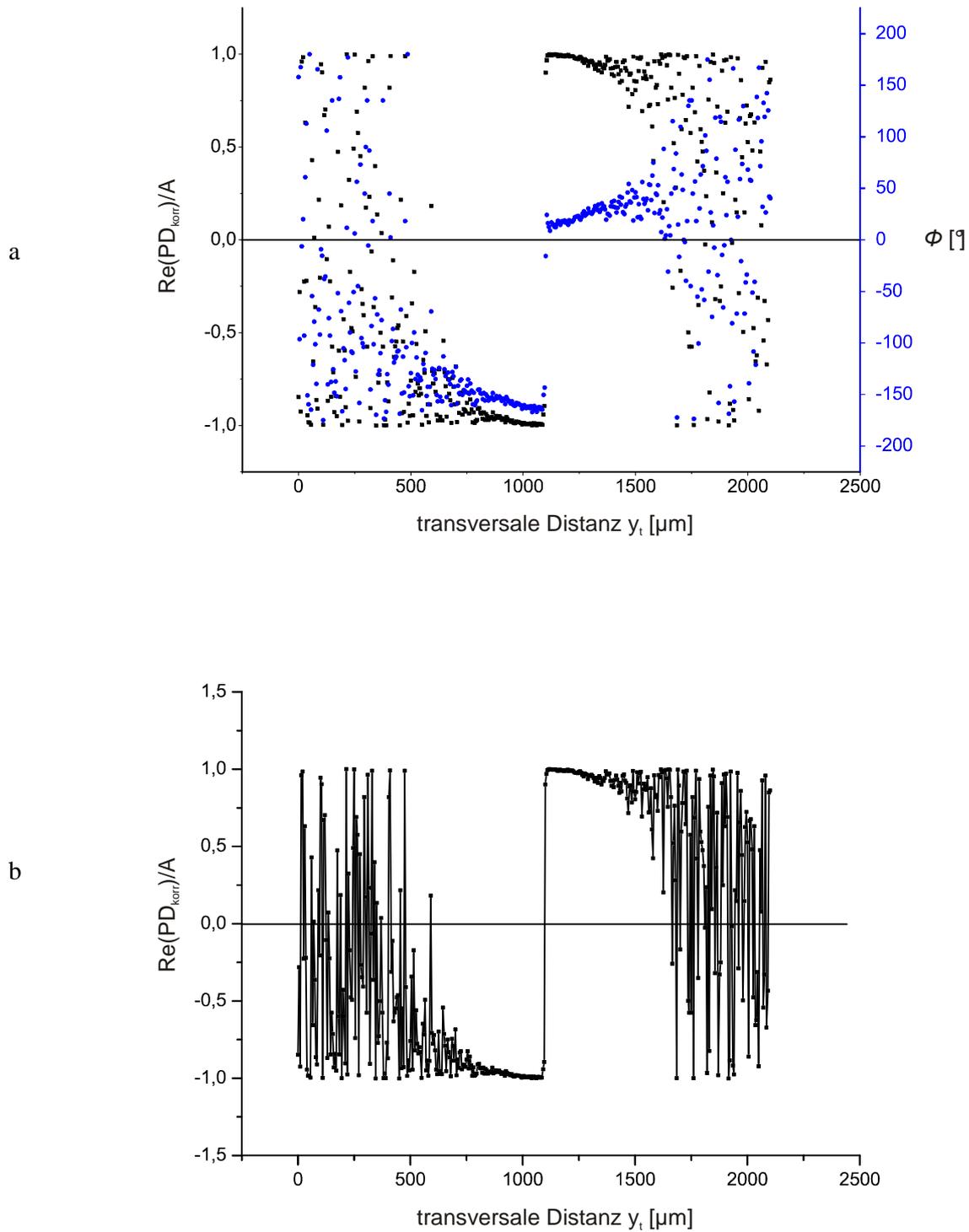


Abbildung 49:

- a) Phase Φ und korrigierter Phasenverlaufs $\text{Re}(PD_{\text{korr}})/A$ beim Zero Crossing einer Probe aus Rinderhuf.
- b) Die Ermittlung der Nulldurchgänge von $\text{Re}(PD_{\text{korr}})/A$ nach dem Phasensprung erwies sich aufgrund des starken Rauschens im Bereich der Nullstellen für Keratinproben als nicht reproduzierbar. (Methode: PDS Single Beam Laser Scanning System)

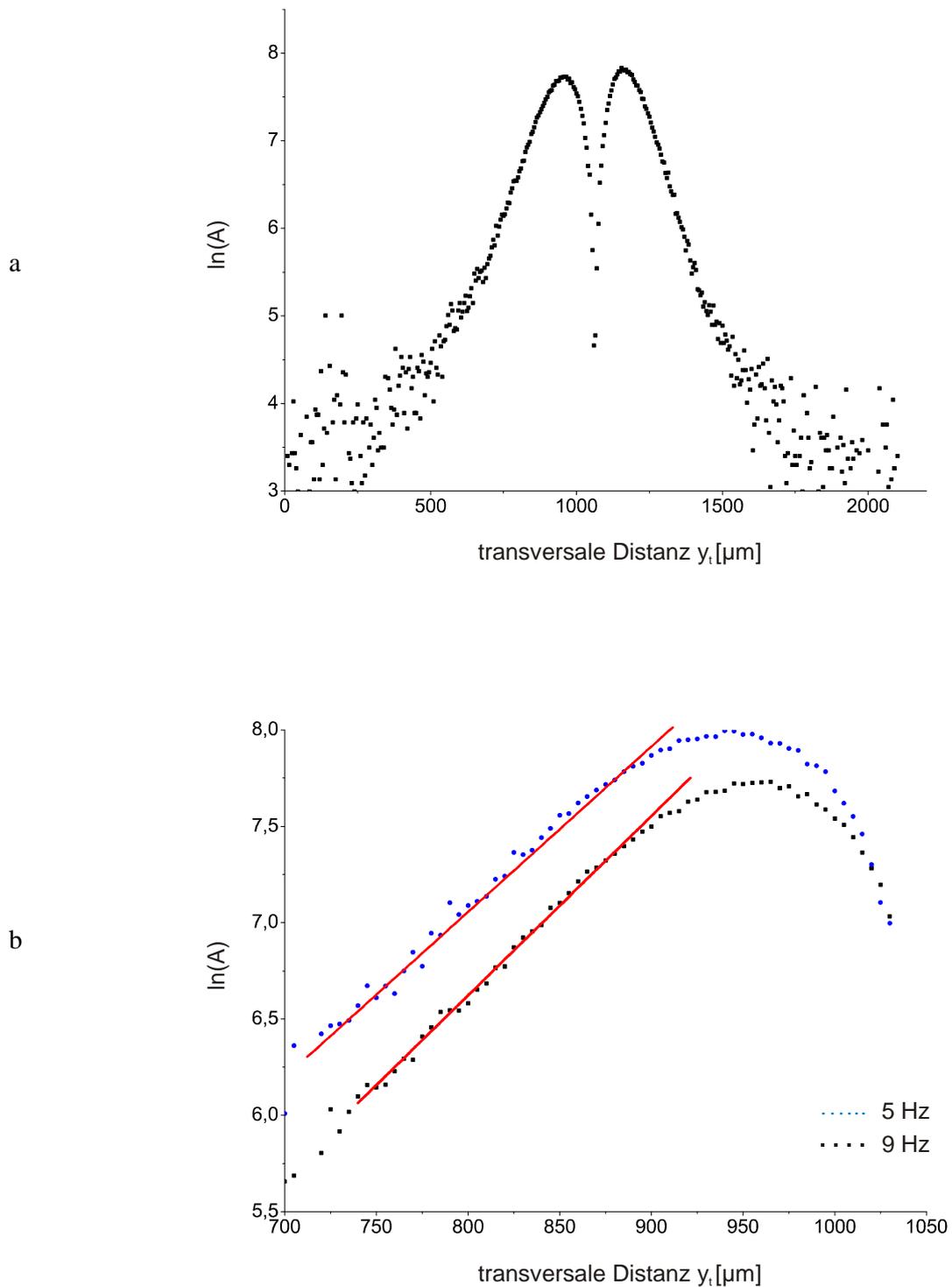


Abbildung 50:

- Verlauf der Amplitude in Abhängigkeit von der transversalen Distanz beim Zero Crossing an einer Probe aus Rinderhuf ($f = 13$ Hz).
- Auswertung des Anstiegs m der tangentialen Geraden am Amplitudensignal ($f = 5$ und 9 Hz). (Methode: PDS Single Beam Laser Scanning System)

Tabelle 14:

Thermische Diffusivität von Rinderhuf bestimmt mittels a) Amplituden Methode und b) Laser Flash Methode.

Frequenz [Hz]	5	7	9	11	13
a)					
$\alpha \times 10^{-7} [\text{m}^2/\text{s}]$	$1,59 \pm 0,26$	$2,19 \pm 0,19$	$2,40 \pm 0,76$	$2,79 \pm 0,98$	$3,68 \pm 1,23$
b)					
$\alpha \times 10^{-7} [\text{m}^2/\text{s}]$	$1,53 \pm 0,38$ (frequenzunabhängig)				

Tabelle 15:

Literaturangaben für die Thermische Diffusivität verschiedener Gewebe im Vergleich zu den ermittelten Werten.

Material	α $10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$	Methode	Quelle
Stratum Corneum (human)	0,28	TLS	[24]
	0,29	PDS/TLS	[135]
Nagel (human)	0,89	PAS	[136]
Knochen (human)	4,0	PAS	[137]
Huf (bovine)	1,53	Laser Flash	ermittelte Werte
	1,59	PDS (5 Hz)	ermittelte Werte

Fazit

Die thermische Diffusivität α stellt als physikochemische Materialkonstante eine wesentliche Größe für photothermische Untersuchungen dar. Unter anderem wird sie zur Ermittlung der Mess-tiefe benötigt. Zu ihrer Bestimmung wurden zwei Vorgehensweisen, die auf dem Zero Crossing beruhen, angewendet. Die Messungen erfolgten mit dem in dieser Arbeit entwickelten PD Scanner System. Dabei stellte sich die in der Literatur häufiger verwendete Auswertung des Phasenverlaufs für die Hufproben als ungeeignet heraus. Die Betrachtung des Anstiegs der PD Amplitudenwerte bei niedrigen Modulationsfrequenzen führte zu Ergebnissen, die mit der Referenzmethode (Laser Flash Verfahren) bestätigt werden konnten. Der erhaltene Wert für α lässt sich zwischen den thermischen Diffusivitäten für Knochen und Nagel einordnen.

4.5. Tiefenmessungen zur Penetration an Keratinmembranen

Für die Betrachtung des Wirkstofftransports *in situ* sind Methoden geeignet, die unter Variation der Messtiefe verschiedene Orte in einer Probe abtasten können. Insbesondere die konfokale Raman Mikroskopie wurde mehrfach für derartige Untersuchungen verwendet [15-17, 120, 122, 138-142]. Außerdem kamen verschiedene Formen der photothermischen Spektroskopie für derartige Untersuchungen zur Anwendung, wie die Puls-PAS [143-145], die FTIR-PAS [8, 10, 77, 86, 146, 147] sowie radiometrische Methoden [148-155]. Die PDS wurde in den 1990er Jahren in Veröffentlichungen von Giese et al. zur Untersuchung der Hornschicht Penetration in *in-vivo*-Experimenten verwendet [50, 51, 156]. PD Messungen, die Membranen tiefenaufgelöst darstellen können, sind in der Literatur jedoch nur in geringer Zahl zu finden [157, 158] und wurden für dynamische Systeme bislang nicht realisiert. Um die Verwendbarkeit der PDS als zeit- und tiefenaufgelöstes Messverfahren zu evaluieren, wurde der vorliegende Versuch entwickelt (vergleiche Kapitel 3.8.3). Anhand von Frequenzmodulation und Wiederholmessungen wurde das PD Signal orts- und zeitabhängig aufgezeichnet. Die Raman Mikroskopie wurde als Referenzverfahren eingesetzt. Identische Versuche die mit beiden Methoden durchgeführt wurden, sollten eine Aussage über die Eignung der Verfahren für die tiefenaufgelöste Messung erlauben.

Mit Hilfe von Voruntersuchungen wurde zunächst die Freisetzung von Mo aus den Formulierungen F1 und F2 betrachtet. Dazu wurden hydratisierte Keratinmembranen ($L = 45 \mu\text{m}$) für 24 Stunden mit den Formulierungen in Kontakt gebracht. Nach dem Entfernen, Reinigen mit Zellstoff und Trocknen (bei Raumtemperatur $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ und Raumfeuchtigkeit $40 \% < rF < 60 \%$) wurden PD Imaging Messungen an den von den Kontaktflächen abgewandten Seiten der Membranen durchgeführt. Die Modulationsfrequenz betrug $f = 20 \text{ Hz}$ ($\mu = 50 \mu\text{m}$ bei $\alpha = 1,59 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$); damit war sichergestellt, dass die gesamte Schichtdicke photothermisch erfasst wurde. Abbildung 51 zeigt für die Freisetzung aus F1 eine homogene Verteilung von Mo im Kontaktbereich, während der Stoffübergang aus F2 eine heterogene Verteilung in der Membran zur Folge hatte und Mo nur in Spuren zu detektieren war. Der Übergang der in der Suspension F2 ungelöst vorliegenden Mo Partikel in die Membran erfolgte nur punktuell dort, wo es durch direkten Kontakt zwischen Substanz und der hydrophilen Akzeptormatrix zur Lösung von Mo Partikeln kam. Hingegen konnten die gelösten Mo Moleküle aus der hydrophilen Creme F1 leicht in den Akzeptor penetrieren. Aufgrund der hohen Wirkstoffkonzentration im Donator wurde dessen Konzentration als konstant angenommen. Die laterale Diffusion wurde nicht speziell betrachtet, doch zeigt das Image 51 a, dass außerhalb der Kontaktfläche (weiße gestrichelte Linie) kein Mo gefunden wurde. Aufgrund der Freisetzungseigenschaften wurde für die Untersuchungen zur Tiefenmessung mit dem System F1 gearbeitet.

Ein Versuch nach dem Prinzip T1 mit dem Raman Mikroskop sollte einen Überblick über die Kinetik der Penetration geben (Kapitel 3.8.3). Die Raman Spektren (Abb. 52) zeigen die vom Keratin stammenden Banden bei 1002 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} , welche der Streckschwingung (C-C) im Benzolring des Phenylalanins bzw. der Streckschwingung der CO Gruppe (Amid I Bande) zuzuordnen sind. Im Bereich zwischen den beiden Keratin Schwingungen sind zahlreiche Banden zu erkennen, die Mo zugeordnet werden können. Während die Signale der Keratinmembran mit zunehmender Versuchsdauer konstant bleiben, ist ein Anwachsen der Mo Banden bis 720 Minuten zu erkennen. Danach erfolgt keine weitere Zunahme, was auf das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes schließen lässt. Die exakte Messtiefe der Raman Messungen konnte nicht genau definiert werden, da die fokussierten Strahlen des Anregungslasers beim Übertritt von der Gasphase in die Probe aufgrund der Unterschiede in den Brechungsindices ($n_g < n_p$) abgelenkt werden. Da n_p für die Keratinmembran im Rahmen der Arbeit nicht ermittelt werden konnte, war eine Korrektur der Eindringtiefe nach Gleichung 40 nicht möglich. Die Initialmessung ($t = 0$) wies keine durch Mo bedingten Banden auf, diese wuchsen erst im Verlauf des Experiments an. Des-

halb konnte angenommen werden, dass die tatsächliche Messtiefe z kleiner als die Dicke der Probe war ($\Delta < L$).

Die photothermische Messung erlaubt anhand der Modulation der Frequenz des Anregungslasers die Messtiefe zu variieren. Der AL ist auch in diesem Fall fokussiert, allerdings mit sehr viel längerer Brennweite, weshalb beim Übertritt zwischen Luft und Probe die Ablenkung der Strahlen wesentlich geringer ausfällt. Hinzu kommt, dass, anders als bei der Raman Mikroskopie, nicht die gestreute Strahlung eines definierten Punktes detektiert wird, sondern die Ausbreitung thermischer Wellen, welche in Abhängigkeit von ihrer Frequenz einen definierten Weg zurücklegen. Somit ist der Einfluss des Verhältnisses der Brechungsindizes n_p/n_i deutlich geringer ausgeprägt als bei der konfokalen Raman Mikroskopie und kann vernachlässigt werden. Die Ergebnisse der PD Messungen zeigen einen Anstieg der Amplitude des PD Signals A über die Zeit (Abbildung 52 b). Der Kurvenverlauf A gegen t folgt annähernd einer Exponentialfunktion, die dem Verlauf der Konzentration von Mo in der untersuchten Schichtdicke direkt proportional ist. Gleichzeitig ist der Signalanstieg bei höheren Frequenzen weniger deutlich ausgeprägt. Dies ist einerseits bedingt durch die geringere Konzentration von Mo in der untersuchten Schicht. Andererseits verkleinert sich mit steigender Frequenz die abgetastete Schichtdicke, die zum PD Signal beitragen könnte (Tabelle 17). Um diesen Effekt zu nivellieren und Unterschiede im Konzentrationsverlauf in Abhängigkeit von der Messtiefe aufzuzeigen, wurden die Messwerte der PD Amplitude normiert und aufgrund der direkten Proportionalität $A/A_{max} \sim c/c_{max}$ als c/c_{max} bezeichnet (Abb. 53 (a)). Anhand von μ und L konnte der Diffusionsweg l_D berechnet werden, den die Mo Moleküle von der Grenzfläche der Formulierung bis zum Messpunkt zurücklegen. Der insgesamt abgetastete Membranbereich umfasst $71 \mu\text{m}$, wobei Diffusionsschichtdicken von $l_D = 19 \mu\text{m}$ ($f = 10 \text{ Hz}$) bis $l_D = 55 \mu\text{m}$ ($f = 40 \text{ Hz}$) erreicht werden konnten. Die zweidimensionale Farbdarstellung zeigt, dass der Verlauf der Konzentrationskurve bis etwa 400 Minuten von l_D abhängig ist. Mit zunehmendem Diffusionsweg ist im unteren Bereich ($t < 400 \text{ min}$) ein verzögerter Anstieg der Konzentrations-Zeit-Kurve zu verzeichnen. Ab etwa 700 Minuten ist ein Gleichgewichtszustand in der Membran erreicht, was auch die Raman Messungen bestätigen.

Eine Möglichkeit den Diffusionskoeffizienten D zu bestimmen, besteht darin, mittels der komplementären Fehlerfunktion $\text{erfc}(x)$ eine Anpassung an die Konzentrations-Zeit-Kurve vorzunehmen (Abb. 53 b). Dabei repräsentiert der Kurven-Fit den idealen Konzentrationsverlauf für die Randbedingung $c_d = \text{konstant}$. Die erhaltenen Messwerte zeigen eine gute Korrelation zur angepassten Funktion ($R^2 > 0,981$), auch wenn besonders im Anfangsbereich des Prozesses Daten und Funktion nicht genau übereinanderliegen. Möglicherweise waren als Ursache hierfür die angenommenen Randbedingungen im Experiment nicht optimal umgesetzt. Denkbar wäre, dass die Konzentration im Donator nicht als konstant angenommen werden kann, oder dass die Mo Konzentration in der Membran zu Beginn präparationsbedingt schon angestiegen war.

Dennoch sind diese Daten Beleg dafür, dass hier der Diffusionsprozess von Mo in einer Keratinmembran durch Anwendung der PDS sichtbar wird.

Der Einfluss des Diffusionsweges l_D auf den Verlauf der Konzentrationskurve zeigt sich am Kurvenparameter $t_{1/2}$, der mit zunehmendem Diffusionsweg ebenfalls wie erwartet ansteigt (Abb. 54). Anhand des Parameters b der erfc Funktion und des Diffusionsweges kann außerdem der Diffusionskoeffizient bestimmt werden $D = (b/l_D)^2$. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse für die ermittelten Diffusionskoeffizienten dargestellt. Zu erkennen ist, dass abhängig vom Diffusionsweg eine Zunahme von D bis $l_D = 40 \mu\text{m}$ vorliegt, erst ab diesem Wert ist $D = \text{konst.}$ Als Ursache hierfür können wieder Diskrepanzen bei angenommenen und realisierten Randbedingungen in Frage kommen. Mitunter tritt bei niedrigen Modulationsfrequenzen ein Sättigungseffekt des PD Signals auf, was auch einen Grund für die gefundene Abhängigkeit darstellen könnte.

Tabelle 16: Ergebnisse für den Diffusionskoeffizienten D und $t_{1/2}$ für verschiedene Diffusionsschichtdicken l . Die Berechnung des Diffusionsweges erfolgte über die thermische Diffusionslänge μ ($\alpha = 1,59 \times 10^{-7} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$).

Frequenz [Hz]	10	15	20	25	30	35	40
Messtiefe [μm]	71	58	50	45	41	38	35
Diff.-weg l [μm]	19	32	40	45	49	52	55
$t_{1/2}$ [min]	298	310	321	326	369	362	410
$D \times 10^{-9}$ [cm^2s^{-1}]	5	13	19	24	24	29	26

Fazit

Der Vergleich der Freisetzung der Modellsubstanz Mo aus zwei Formulierungen anhand der Penetration in eine Keratinmembran wurde mittels PD Imaging durchgeführt und zeigte die erwartete Überlegenheit der hydrophilen Creme gegenüber der Suspension. Weiterführende Untersuchungen mittels Raman- und PD Punktmessungen konnten übereinstimmend darlegen, dass nach etwa 700 Minuten ein Gleichgewichtszustand der Mo Konzentration in der Membran eintritt. Es war möglich durch die Modulation der PDS Anregungsstrahlung einen Tiefenbereich zwischen 35 und 71 μm in der Membran zu untersuchen und für verschiedene Ebenen Konzentrations-Zeit-Kurven aufzunehmen. Die erhaltenen Messdaten wurden anhand der erfc Funktion einem Daten-Fit unterzogen. Die Übereinstimmung zwischen den experimentell ermittelten Daten und der theoretischer Diffusionskurve zeigt, dass ein Diffusionsvorgang die Grundlage für die erhaltenen PD Messergebnisse darstellt. Die PDS erwies sich hier der Raman Mikroskopie als gleichwertiges Verfahren. Darüber hinaus ergaben sich für die PD Messungen schärfer definierte Konzentrations-Zeit Kurven, anhand derer es möglich war, abschließend den Diffusionskoeffizient für die Penetration von Mo in die Keratinmembran zu bestimmen.

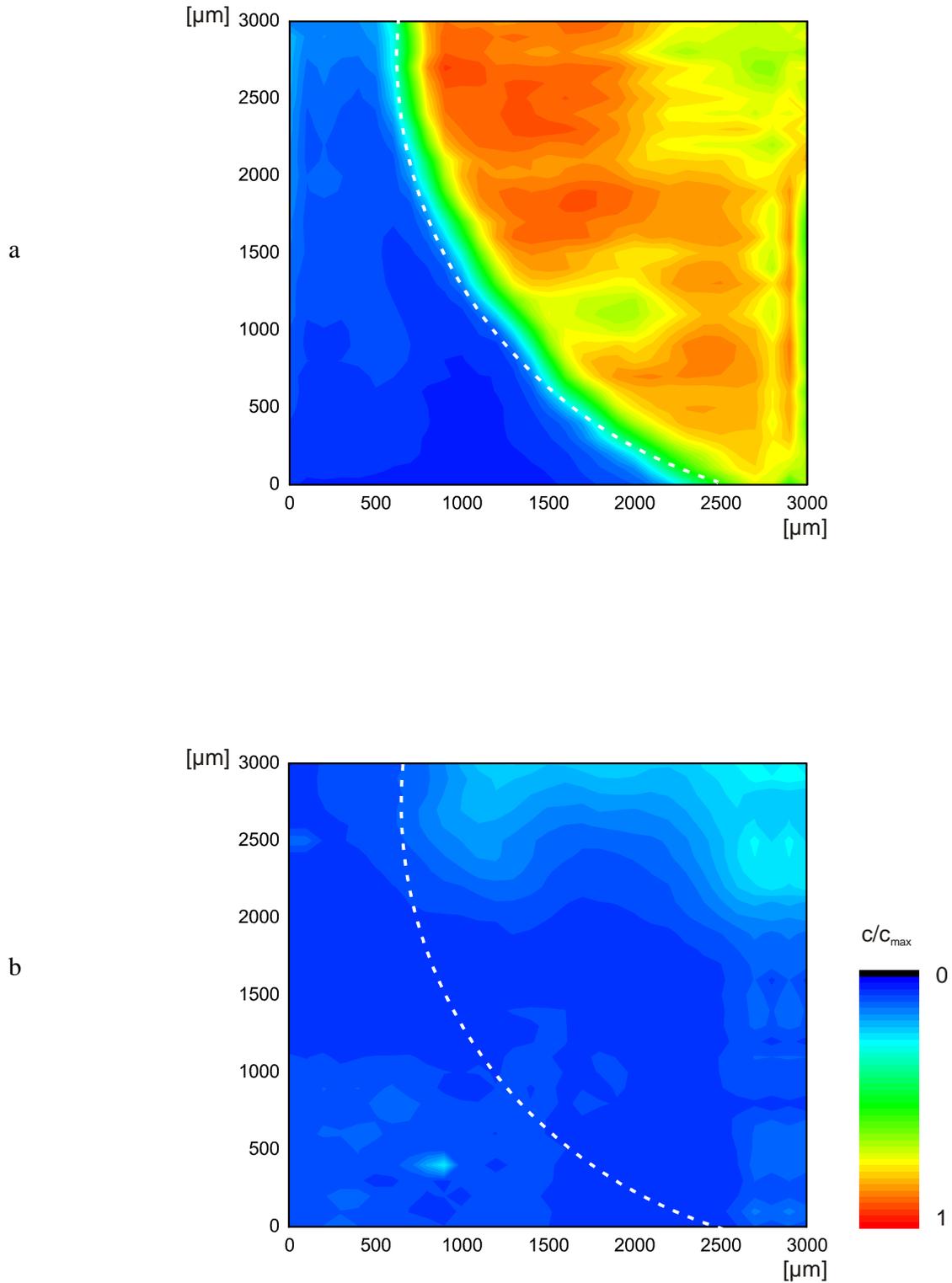


Abbildung 51: PD Imaging des Mo Gehalts von Keartinmembranen. Als Mo Donator wurden a) Unguentum emulsificans aquosum N und b) Vaselineum album eingesetzt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Begrenzung der Kontaktfläche von Formulierung und Membran. Die Werte wurden auf das Signalmaximum aus beiden Messungen normiert. (Methode: PDS Monobloc)

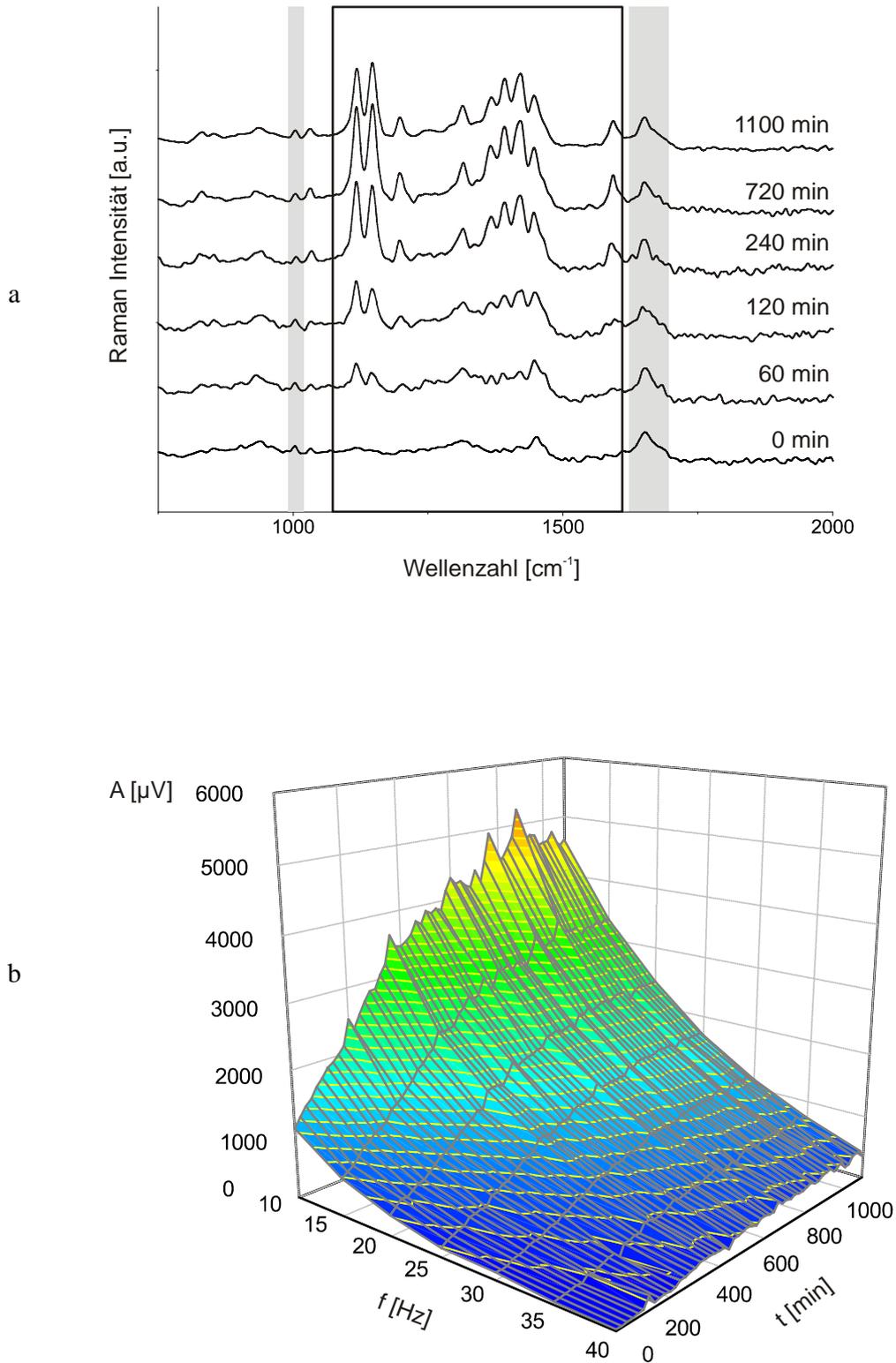


Abbildung 52: Anstieg der Mo Konzentration in der Keratin Membran

- a) Zunahme der Mo Banden während der Wirkstoffpenetration in eine Keratinmembran (Box). Die für Keratin signifikanten Banden bleiben konstant (grau unterlegt). (Methode: Raman Mikroskopie)
- b) Amplitude des PD Signals im Verlauf des Penetrationsexperiments für den Frequenzbereich 10 Hz bis 40 Hz. (Methode: PDS Monobloc)

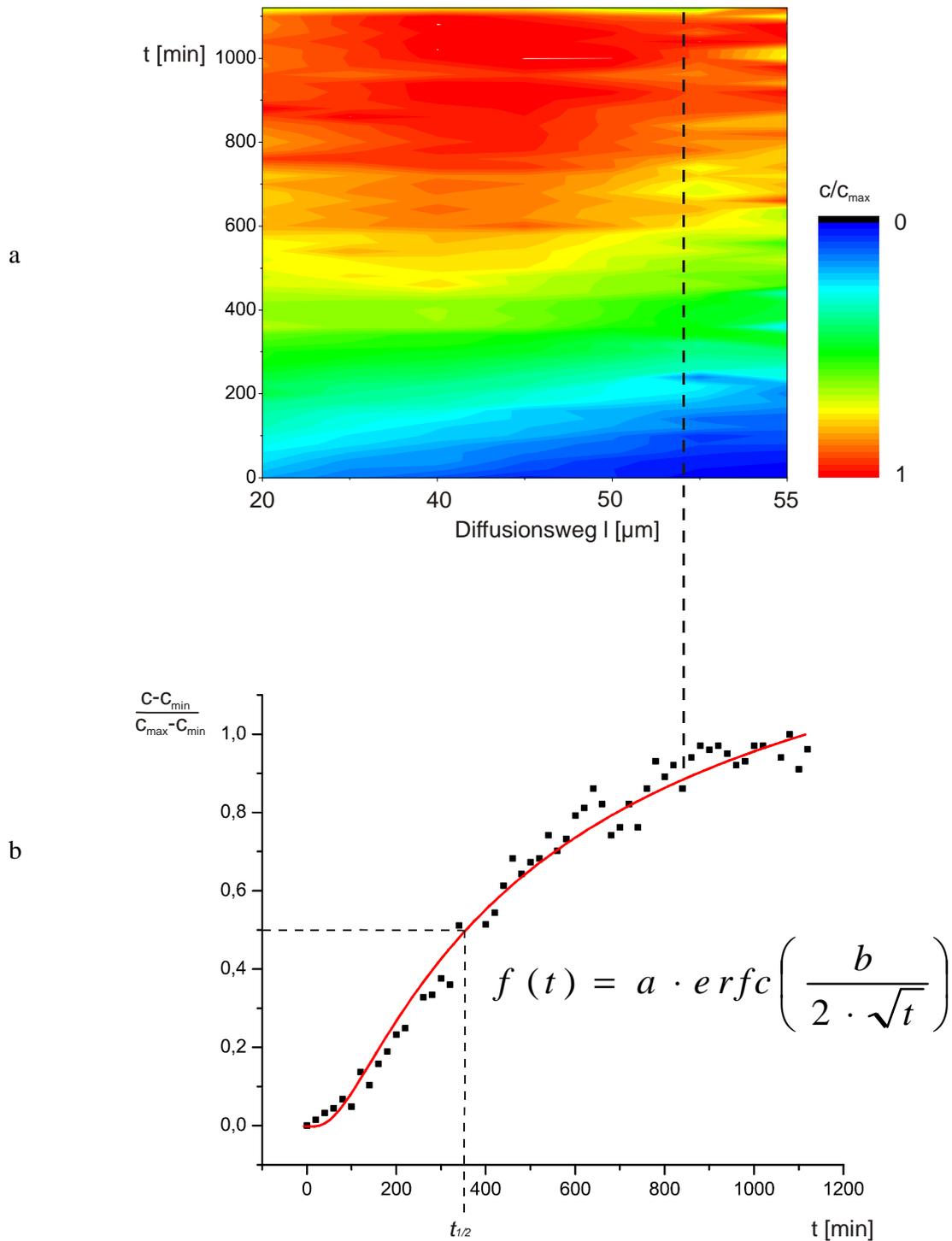


Abbildung 53:

a) Konzentrations-Zeit Kurve für Mo in der Keratinmembran in Abhängigkeit vom Diffusionsweg als zweidimensionale Darstellung. (Methode: PDS Monobloc)

b) Normierte Konzentrations-Zeit Kurve (Diffusionsweg $s = 52 \mu\text{m}$) mit Datenanpassung anhand der Komplementären Fehlerfunktion erfc ($R^2 = 0,984$). (Methode: PDS Monobloc)

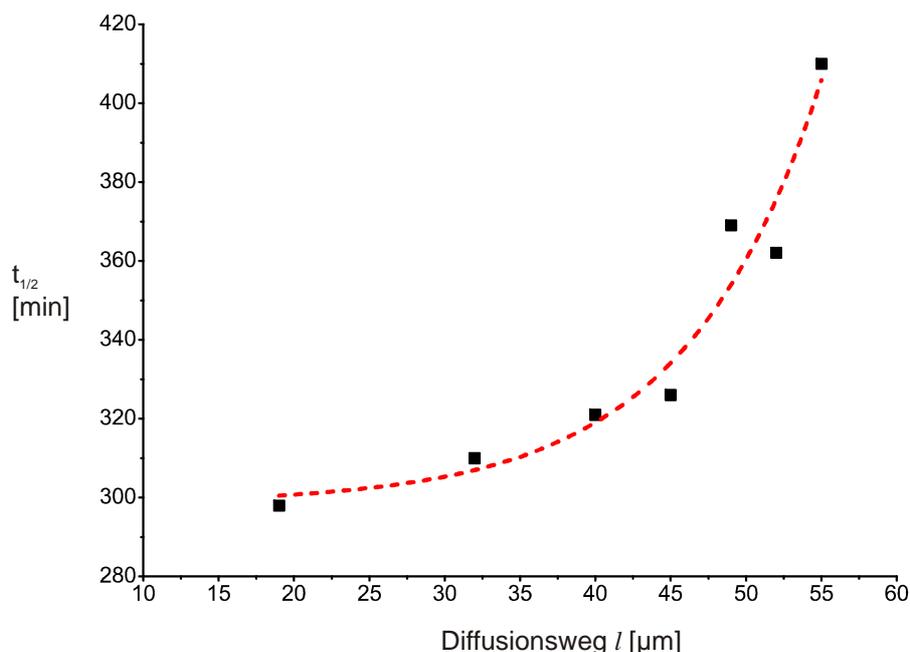


Abbildung 54

Abhängigkeit für $t_{1/2}$ vom Diffusionsweg bei der Penetration von Mo in eine Keratinmembran.
(Methode: PDS Monobloc)

5. Fazit und Perspektiven

Trotz der Entwicklung von Modellen zur Vorhersage von Freisetzungs- und Penetrationsverhalten von Wirkstoffen, basieren heute Methoden zur Untersuchung topischer Formulierungen und deren Eigenschaften weitestgehend auf statistischer Versuchsplanung. Diese Verfahren sind meist sehr aufwendig. Neben der Gewinnung der Proben schließt sich häufig eine zeitintensive Analytik an. Zur Etablierung effektiver und gleichzeitig sehr aussagekräftiger Vorgehensweisen wurde in den letzten Jahren vermehrt auf die Anwendung spektroskopischer Methoden gesetzt. Wobei sich insbesondere die Raman Mikroskopie als kontaktloses Messverfahren im Bereich von Penetrationsmessungen an humaner Haut etablieren konnte. Eine für derartige Untersuchungen vielversprechende aber bisher weniger beachtete Technologie ist die photothermische Ablenkungsspektroskopie. In der vorliegenden Arbeit sollte die Verwendung der PDS für biopharmazeutische Fragestellungen erprobt werden, wobei die Betrachtung des Wirkstofftransports in Membranen im Fokus stand. Zunächst wurde ein für die anstehenden Fragestellungen bedarfsgerechtes Messgerät in Kooperation mit dem IFG (Institut für Funktionelle Grenzflächen) am Karlsruhe Institute of Technology entwickelt. Die Entwicklung einer neuen Software zur Steuerung des Messgeräts und zur Datenvisualisierung erlaubte photothermische Untersuchungen in drei Modi durchzuführen, nämlich dem PD Imaging als bildgebendes Messverfahren, der PD Punktmessung und dem Zero Crossing zur Charakterisierung der thermischen Diffusivität von Materialien. Die Datenerfassung konnte mit der neuen Software zeitaufgelöst, d. h. mittels Wiederholmessungen und unter Modulation der Frequenz der Anregungsstrahlung erfolgen, wodurch die dreidimensionale Charakterisierung von Proben ermöglicht wurde. Die erhaltenen Erkenntnisse wurden zur Konstruktion eines photothermischen Scanners verwendet. Ein Scanner hat den Vorteil, dass Proben für Flächenmessungen nicht mehr bewegt werden müssen. Zwei Varianten dieses neuen Messgeräts wurden gebaut. Während das Double Beam Laser Scanning System vor allem von seiner kompakten Bauweise profitiert, erwies sich das Single Beam Laser Scanning System, aufgrund des fahrbaren Detektionsarms, als besonders gut geeignet für die Untersuchung der thermischen Diffusivität, da sich die thermische Linse automatisch vermessen ließ.

Mittels der Konzentrationsbestimmung verschiedener Wirkstoffe in Vaselinum album Suspensionen erfolgte eine Auswahl von Substanzen für weitere Untersuchungen und gleichzeitig wurde ein Vergleich mit anderen spektroskopischen Methoden vorgenommen. Es zeigte sich, dass die PDS für Nachweis- und Bestimmungsgrenze vergleichbare Ergebnisse erbrachte wie die Referenzmethoden, und dass für die Nachweisempfindlichkeit eine besonders starke Abhängigkeit von der Wellenlänge der Anregungsstrahlung besteht. Somit ergab sich als Voraussetzung für die photothermische Detektion eine gewisse Übereinstimmung von Anregungswellenlänge und dem Absorptionsmaximum der zu bestimmenden Substanz. Aus diesem Grund kam nur eine begrenzte Anzahl von Modellstoffen für die folgenden Versuche in Frage, wobei primäres Kriterium für die Anwendung in dieser Arbeit die optischen Eigenschaften waren. Verwendet wurden Methoxsalen (Me), Ketokonazol (Ke), Curcumin (Cu), Dithranol (Di) und Methylorange (Mo). Die Modellstoffe bildeten zusammen mit einfachen Grundlagen wie Vaselinum album und Unguentum emulsificans aquosum N, die nur geringe Absorption zeigten, die Formulierungen für die Versuche. Als Anregungsquellen standen Laser der Wellenlängen 473 nm, 532 nm 1064 nm und ein CO₂ Laser, der zwischen 10,25 µm und 10,80 µm emittierte, zur Verfügung. Als für die Penetrationsexperimente geeignete Systeme erwiesen sich die Substanzen Cu, Di und Mo mit Laseranregung im sichtbaren Bereich. Obwohl der IR Laser den Vorteil hat, einen gewissen Wellenlängenbereich abzudecken und somit für verschiedene Substanzen als Anregungsquelle in Frage kommt, stellte sich doch heraus, dass diese Art von Anregung für die Fragestellung in dieser Arbeit eher ungeeignet war.

Die Anwendung des PD Imaging für die zeitaufgelöste bildgebende Darstellung des Stofftransports in lipophilen Dodecanol-Kollodium-Membranen erlaubte neue Einblicke in das Diffusionsverhalten und die Freisetzung von Wirkstoffen. Dies konnte anhand der Diffusion der Substanzen Dithranol und Curcumin aus suspensionsartigen Formulierungen in lipophile DDC Membranen gezeigt werden. Durch Zusatz von Propylenglykol zu Cu Suspensionen konnte ein lateraler Transport des Wirkstoffs in der Membran erreicht und mittels PD Imaging visualisiert werden. Als Folge der Anregung mit Lasern im visuellen Bereich kam es allerdings zu photochemischen Reaktionen der Wirkstoffe Cu und Di, wodurch sich deren Absorptionsverhalten veränderte und eine direkte Korrelation von PD Signal und Konzentration nicht vorlag. Zum Teil konnten die Messwerte durch Normierung vergleichbar gemacht werden. Auf Kosten der Sensitivität ließen sich diese Effekte durch die Verwendung einer Anregungsquelle, deren Wellenlänge im Vergleich zum Absorptionsmaximum des Analyten verschoben war, reduzieren. Als Referenzmethode wurde die konfokale Raman Mikroskopie verwendet, deren Ergebnisse die erhaltenen photothermischen Resultate weitgehend bestätigten und somit die Richtigkeit der PD Messungen belegten.

Die PD Punktmessung stellt eine sehr präzise Möglichkeit der photothermischen Charakterisierung dar und ergänzt somit den Imaging Modus, der eher einen Überblick über die Oberflächeneigenschaften einer Probe gewährt. Durch kurze gezielte Messungen an bestimmten Koordinaten nimmt außerdem die Bestrahlungszeit des Materials deutlich ab, wodurch auch lichtempfindliche Substanzen analysiert werden können. Durch Punktmessungen in definierten Abständen zur Diffusionsgrenze konnte der Diffusionskoeffizienten D für Dithranol in Dodecanol-Kollodium-Membranen aus den erhaltenen Werten für t_{lag} mit guter Reproduzierbarkeit erhalten werden. Wieder wurde die Raman Mikroskopie als Referenz eingesetzt. Grundsätzlich wurden die photothermischen Resultate bestätigt. Darüber hinaus wurden die Wirkstoffkonzentrationen in der DDC Membran erhalten. Die Ermittlung von D mittels Raman Mikroskopie war jedoch nicht analog zur PDS möglich, da die Bestimmung von t_{lag} nicht reproduzierbar war.

Die thermische Charakterisierung von Materialien anhand der thermischen Diffusivität wird unter anderem zur Ermittlung der Messtiefe benötigt. Zu ihrer Bestimmung wurden zwei Vorgehensweisen, die auf dem Zero Crossing beruhen, angewendet. Die Messungen erfolgten mit dem in dieser Arbeit entwickelten PD Scanner System. Dabei stellte sich die in der Literatur häufiger

verwendete Auswertung des Phasenverlaufs für die Hufproben als ungeeignet heraus. Die Betrachtung des Anstiegs der PD Amplitudenwerte bei niedrigen Modulationsfrequenzen führte zu Ergebnissen, die mit der Referenzmethode (Laser Flash Verfahren) bestätigt werden konnten. Der erhaltene Wert für α lässt sich zwischen den thermischen Diffusivitäten für Knochen und Nagel einordnen.

Eine große Herausforderung und gleichzeitig die faszinierendste Anwendung stellte die Realisierung der zeitaufgelösten Tiefenmessung dar. Es war möglich durch die Modulation der PDS Anregungsstrahlung einen Tiefenbereich zwischen 35 und 71 μm in der Membran zu untersuchen und für verschiedene Ebenen Konzentrations-Zeit-Kurven aufzunehmen. Die Übereinstimmung der Messdaten mit der theoretischen Diffusionskurve zeigen, dass eine durch Diffusion bedingte Konzentrationszunahme des Wirkstoffs Grundlage für die erhaltenen PD Messergebnisse war. Abschließend wurde der Diffusionskoeffizient für die Penetration von Mo in die Keratinmembran bestimmt. Raman Messungen konnten keine vergleichbare Tiefenauflösung bieten, dennoch zeigten die Ergebnisse wieder eine Übereinstimmung mit den PD Versuchen.

In Hinblick auf die Anwendung der Laserspektroskopie *in vivo* müssen die gültigen Gesetze und Verordnungen berücksichtigt werden. Laut DIN EN 60 825 – 1:2003 liegt die maximal zulässige Bestrahlung von Haut für Wellenlängen zwischen 400 nm und 700 nm bei 2000 W/m^2 , wenn die Bestrahlungsdauer zwischen 10 und 10^3 Sekunden liegt. Dieser Bereich würde sowohl für Raman als auch für die PD Messungen Anwendung finden. Beide Methoden überschreiten diesen Grenzwert deutlich (bis um das 200-fache). Allerdings handelt es sich um einen Grenzwert zur Unfallverhütung. Für die beabsichtigte Bestrahlung sehr kleiner Hautareale unter ärztlicher Kontrolle sind sicher weitaus höhere Werte möglich, was im Rahmen von Ethikkommission für einzelne Studien geklärt werden muss. In zahlreichen Publikationen, in denen auch *in-vivo*-Studien durchgeführt wurden, kamen vergleichbare und zum Teil höher Intensitäten zum Einsatz.

Zusammenfassend zeigen sich die Stärken der PDS in der kontaktlosen Charakterisierung von Materialien, die dank des Laser-Scanning-Systems für die Analyse nun auch unbewegt bleiben können. Neben einer hohen Nachweisempfindlichkeit für bestimmte Substanzen ist besonders die hohe räumliche Auflösung von PD Messungen hervorzuheben. Anhand der thermischen Diffusionslänge können Messergebnisse auf Bereiche unterhalb der Oberfläche einer Probe bezogen werden, wie dies für das Tiefenprofil der Konzentration eines Wirkstoffs in einer biologischen Membran gezeigt wurde. Für die Durchführung kontaktloser Tiefenmessungen erwies sich die PDS der konfokalen Raman Mikroskopie überlegen, da optische Effekte, wie Lichtbrechung, für die PDS vernachlässigt werden können. Für die Raman Mikroskopie muss dieser Umstand jedoch aufwendig rechnerisch korrigiert werden oder man verzichtet auf den Vorteil des kontaktlosen Messens und verwendet Immersionsflüssigkeiten, wodurch auch die Raman Mikroskopie sehr hohe Tiefenauflösung erreichen kann. Mittels der photothermischen Untersuchung von Proben werden keine chemischen Informationen erhalten, wie sie die Spektren der Raman oder der IR Spektroskopie beinhalten. Das zu untersuchende System muss bereits bekannt sein, wichtige Kenngrößen sind der Brechungsindex, der Absorptionskoeffizient und die thermische Diffusivität. Die Nachteile dieses Verfahrens ergeben sich größtenteils durch die Anwendung von Laserquellen. Denn durch die hohe Energiedichte der Laserstrahlung werden auch hohe Anforderungen an den Anwender gestellt. Hinzu kommt, dass bei gleichzeitig hohen Stückkosten pro Laser in der Regel nur eine Wellenlänge zur Verfügung steht, so dass momentan nur eine geringe Zahl von Substanzen überhaupt untersucht werden kann.

Für die Zukunft wäre eine Anregungsquelle von Interesse, die nicht nur auf zwei oder drei Wellenlängen beschränkt ist. Dies könnte durch die Verwendung von kostengünstigen Laserdioden realisierbar sein, welche im sichtbaren und nahen UV- sowie im nahen IR- Bereich bis zu Wellenlängen von 1000 nm erhältlich sind. Ein Messgerät mit zahlreichen Anregungslinien wäre vorstellbar, wodurch viele Wirkstoffe mit der photothermischen Analyse bestimmbar wären.

6. Literatur

1. Niedner, R. and Ziegenmeyer, J., *Dermatika*. 1992, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. p. 679.
2. Neubert, R.H.H., Wohlrab, W.A., and Marsch, W.C., *Dermatopharmazie*. 2001: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. p. 178.
3. Touitou, E., Junginger, H.E., Weiner, N.D., Nagai, T., and Mezei, M., *Liposomes as Carriers for Topical and Transdermal Delivery*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1994. **83**(9): p. 1189-1203.
4. Barry, B.W., *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001. **14**(2): p. 101-114.
5. Hartmann, M., Hanh, B.D., Podhaisky, H., Wensch, J., Bodzenta, J., Wartewig, S., and Neubert, R.H.H., *A new FTIR-ATR cell for drug diffusion studies*. *Analyst*, 2004. **129**(10): p. 902-905.
6. Hanh, B.D., Neubert, R.H.H., and Wartewig, S., *Investigation of drug release from suspension using FTIR-ATR technique: part I. Determination of effective diffusion coefficient of drugs*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000. **204**(1-2): p. 145-150.
7. Hanh, B.D., Neubert, R.H.H., and Wartewig, S., *Investigation of drug release from suspension using FTIR-ATR technique: part II. Determination of dissolution coefficient of drugs*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000. **204**(1-2): p. 151-158.
8. Hanh, B.D., Neubert, R.H.H., Wartewig, S., and Lasch, J., *Penetration of compounds through human stratum corneum as studied by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy*. *Journal of Controlled Release*, 2001. **70**(3): p. 393-398.
9. Wartewig, S. and Neubert, R.H.H., *Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. **57**(8): p. 1144-1170.
10. Hanh, B.D., Neubert, R.H.H., Wartewig, S., Christ, A., and Hentzsch, C., *Drug penetration as studied by noninvasive methods: Fourier transform infrared-attenuated total reflection, Fourier transform infrared, and ultraviolet photoacoustic spectroscopy*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000. **89**(9): p. 1106-1113.
11. Rosencwaig, A., *Potential Clinical-Applications of Photoacoustics*. *Clinical Chemistry*, 1982. **28**(9): p. 1878-1881.
12. Gotter, B., Faubel, W., and Neubert, R.H.H., *Optical methods for measurements of skin penetration*. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2008. **21**(3): p. 156-165.
13. Hata, T.R., Scholz, T.A., Ermakov, I.V., McClane, R.W., Khachik, F., Gellermann, W., and Pershing, L.K., *Non-invasive Raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2000. **115**(3): p. 441-448.
14. Matousek, P., Draper, E.R.C., Goodship, A.E., Clark, I.P., Ronayne, K.L., and Parker, A.W., *Noninvasive Raman Spectroscopy of human tissue in vivo*. *Applied Spectroscopy*, 2006. **60**(7): p. 758-763.
15. Chrit, L., Bastien, P., Biatry, B., Simonnet, J.T., Potter, A., Minondo, A.M., Flament, F., Bazin, R., Sockalingum, G.D., Leroy, F., Manfait, M., and Hadjur, C., *In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: Assessment of a new moisturizing agent, pMPC*. *Biopolymers*, 2006. **85**(4): p. 359-369.
16. Pudney, P.D.A., Melot, M., Caspers, P.J., van der Pol, A., and Puppels, G.J., *An in vivo confocal Raman study of the delivery of trans-retinol to the skin*. *Applied Spectroscopy*, 2007. **61**(8): p. 804-811.
17. Tfayli, A., Piot, O., Pitre, F., and Manfait, M., *Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy*. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2007. **36**(8): p. 1049-1058.
18. Bell, A.G., *On the Production and Reproduction of Sound by Light*. *American Journal of Sciences*, 1880. **20**: p. 305-324.
19. Rosencwaig, A. and Gersho, A., *Theory of Photoacoustic Effect with Solids*. *Journal of Applied Physics*, 1976. **47**(1): p. 64-69.

20. Parker, J.G., *Optical-Absorption in Glass - Investigation Using an Acoustic Technique*. Applied Optics, 1973. **12**(12): p. 2974-2977.
21. Rosenzwaig, A., *Photoacoustic Spectroscopy of Solids*. Bulletin of the American Physical Society, 1973. **18**(3): p. 357-357.
22. Rosenzwaig, A., *Photoacoustic Spectroscopy of Biological-Materials*. Science, 1973. **181**(4100): p. 657-658.
23. Boccara, A.C., Fournier, D., and Badoz, J., *Thermo-optical Spectroscopy - Detection by the Mirage Effect*. Applied Physics Letters, 1980. **36**(2): p. 130-132.
24. Warner, U., Giese, K., Sennhenn, B., Plamann, K., and Kolmel, K., *Measurement of the Thermal-Diffusivity of Human Epidermis by Studying Thermal Wave-Propagation*. Physics in Medicine and Biology, 1992. **37**(1): p. 21-35.
25. Snook, R.D., Lowe, R.D., and Baesso, M.L., *Photothermal spectrometry for membrane and interfacial region studies*. Analyst, 1998. **123**(4): p. 587-593.
26. Hanh, B.D., Faubel, W., Heissler, S., Wartewig, S., and Neubert, R.H., *Pharmaceutical applications of photothermal beam deflection*. Laser Physics, 2006. **16**(5): p. 794-798.
27. Bell, A.G., Phil. Mag., 1881. **11**: p. 510.
28. Bell, A.G., *The Production of Sound by Radiant Energy*. Science, 1881. **49**: p. 242-253.
29. Rosenzwaig, A., *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*. Vol. 1. 1980, 1980: Wiley & Sons. p. 309.
30. Rosenzwaig, A., *Theory of Photoacoustic Effect with Solids*. Journal of the Acoustical Society of America, 1975. **58**: p. S52-S52.
31. Rosenzwaig, A. and Hall, S.S., *Thin-Layer Chromatography and Photoacoustic Spectrometry*. Analytical Chemistry, 1975. **47**(3): p. 548-549.
32. K.Rajasree, V.V., P.Radhakrishnan, V.P.N.Nampoori, C.P.G.Vallabhan, *Use of mirage effect for the detection of phase transitions in solids*. Measurement Science and Technology, 1992. **4**: p. 435-437.
33. Kuo, P.K., Lin, M.J., Reyes, C.B., Favro, L.D., Thomas, R.L., Kim, D.S., Zhang, S.Y., Inglehart, L.J., Fournier, D., Boccara, A.C., and Yacoubi, N., *Mirage-Effect Measurement of Thermal-Diffusivity .1. Experiment*. Canadian Journal of Physics, 1986. **64**(9): p. 1165-1167.
34. Salazar, A., Sanchez-Lavega, A., and Fernandez, J., *Thermal-Diffusivity Measurements in Solids by the Mirage Technique - Experimental Results*. Journal of Applied Physics, 1991. **69**(3): p. 1216-1223.
35. Salazar, A., Sanchez-Lavega, A., Ocariz, A., Guitonny, J., Pandey, J.C., Fournier, D., and Boccara, A.C., *Novel Results on Thermal-Diffusivity Measurements on Anisotropic Materials Using Photothermal Methods*. Applied Physics Letters, 1995. **67**(5): p. 626-628.
36. Rosenzwaig, A. and Pines, E., *Stratum-Corneum Studies with Photoacoustic Spectroscopy*. Journal of Investigative Dermatology, 1977. **69**(3): p. 296-298.
37. Murphy, J.C. and Aamodt, L.C., *Photothermal Spectroscopy Using Optical Beam Probing - Mirage Effect*. Journal of Applied Physics, 1980. **51**(9): p. 4580-4588.
38. Aamodt, L.C. and Murphy, J.C., *Photothermal Measurements Using a Localized Excitation Source*. Journal of Applied Physics, 1981. **52**(8): p. 4903-4914.
39. Boccara, A.C., Fournier, D., Jackson, W., and Amer, N.M., *Sensitive Photothermal Deflection Technique for Measuring Absorption in Optically Thin Media*. Optics Letters, 1980. **5**(9): p. 377-379.
40. Jackson, W.B., Amer, N.M., Boccara, A.C., and Fournier, D., *Photothermal Deflection Spectroscopy and Detection*. Applied Optics, 1981. **20**(8): p. 1333-1344.
41. Welsch, E. and Ristau, D., *Photothermal measurements on optical thin films*. Applied Optics, 1995. **34**(31): p. 7239-7253.
42. Power, J.F., Fu, S.W., and Schweitzer, M.A., *Depth Profiling of Optical Absorption in Thin Films via the Mirage Effect and a New Inverse Scattering Theory. Part I: Principles and Methodology*. Applied Spectroscopy, 2000. **54**(1): p. 110-126.
43. Janssen, J., Hofmann, G.R., Faubel, W., and J., A.H., *Studies of copper patina by the photothermal beam deflection*. Fres. J. Anal. Chem., 1998. **360**: p. 788-791.
44. Seidel, B.S., Dübel, O., Faubel, W., and Ache, H.J., *Trace Analysis of Pollutants in Water using the Photothermal Interferometry as HPLC-Detector*. Fres. J. Anal. Chem., 1996. **354**: p. 900-902.

45. Franko, M. and Tran, C.D., *Analytical thermal lens instrumentation*. Review of Scientific Instruments, 1996. **67**(1): p. 1-18.
46. Havaux, M., Lorrain, L., and Leblanc, R.M., *Photothermal beam deflection: a new method for in vivo measurements of thermal energy dissipation and photochemical energy conversion in intact leaves*. Photosynthesis Research, 1990. **24**: p. 63-73.
47. Murphy, J.C., Aamodt, L.C., and Spicer, J.W.M., *Principles of Photothermal Detection in Solids*, in *Principles and Perspectives of Photothermal and Photoacoustic Phenomena*, A. Mandelis, Editor. 1992. p. 41-94.
48. *Thickness measurement of coatings and characterization of surfaces with surface waves - Part 2: Guide to the thickness measurement of coatings by photothermic method; German version EN 15042-2:2006*, in *DIN EN 15042-2*. 2006. p. Bild 2.
49. Sakashita, H., Tomita, A., Umeda, Y., Narukawa, H., and Kishioka, H., *Homogeneous Immunoassay Using Photothermal Beam Deflection Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(7): p. 1278-1282.
50. Sennhenn, B., Giese, K., Plamann, K., Harendt, N., and Kölmel, K., *In vivo Evaluation of the Penetration of Topically Applied Drugs into Human Skin by Spektroskopische Methoden*. Skin Pharmacol Physiol, 1993. **6**(2): p. 152-160.
51. Giese, K., Harendt, N., and Kölmel, K. *Horny layer permeation of vitamin E as studied in vivo by spectroscopic techniques*. in *Photoacoustic and Photothermal Phenomena*. 1996. Nanjing.
52. Almond, D.P. and Patel, P.M., *Photothermal Science and Techniques*. 1st ed. Physics and its Applications, ed. E.R. Dobbs and R.A. Palmer. 1996, London: Chapman & Hall. p. 241.
53. Mills, A.F., *Heat Transfer*. 2 ed, ed. M. Horton. 1999, New Jersey: Prentice Hall, Upper Saddle River. p. 954.
54. Baehr, H.D. and Stephan, K., *Wärme- und Stoffübertragung*. 5 ed. Vol. 1. 2006, Berlin: Springer. p. 757.
55. James, D.W., *The Thermal Diffusivity of Ice and Water Between -40 and +60 °C*. J Mater Sc, 1968. **3**: p. 540-543.
56. Touloukian, Y.S., *Touloukian Thermophysical Properties of Matter Thermal Conductivity - Nonmetal Solids*. 1971: John Wiley & Sons Ltd.
57. Raman, C.V. and Krishnan, K.S., *A new kind of secondary radiation*. Nature, 1928. **121**: p. 501-502.
58. Hirschfeld, T. and Chase, B., *FT-Raman Spectroscopy: Development and Justification*. Applied Spectroscopy, 1986. **40**(2): p. 133-137.
59. Wen, Z.Q., *Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(11): p. 2861-2878.
60. McReery, R.L., *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, ed. J.D. Wineforder. Vol. 157. 2000: John Wiley & Sons. p. 420.
61. Everall, N.J., *Modeling and measuring the effect of refraction on the depth resolution of confocal Raman microscopy*. Applied Spectroscopy, 2000. **54**(6): p. 773-782.
62. Everall, N., Lapham, J., Adar, F., Whitley, A., Lee, E., and Mamedov, S., *Optimizing depth resolution in confocal Raman microscopy: A comparison of metallurgical, dry corrected, and oil immersion objectives*. Applied Spectroscopy, 2007. **61**(3): p. 251-259.
63. Everall, N., *The influence of out-of-focus sample regions on the surface specificity of confocal Raman microscopy*. Applied Spectroscopy, 2008. **62**(6): p. 591-598.
64. J.P.Tomba, J.M.P., *Confocal Raman microspectroscopy with dry objectives: A depth profiling study on polymer films*. Vibrational Spectroscopy, 2007. **44**: p. 62-68.
65. Stricker, H., *Physikalische Pharmazie*. 3 ed. 1987, Stuttgart. p. 587.
66. Crank, J., *The Mathematics of Diffusion*. 1st ed. 1970, Bristol: Oxford University Press. p. 347.
67. Faubel, W., Klewe-Nebenius, Misaelidis, H.P., Pichler, B., and Vendl, A., *Non-destructive Surface Control Atmospherically Corroded Copper and Bronze Objects*. Italian Society for Non-Destructive Testing Monitoring Diagnostics (AIPnD) Arte 99, 1999. **1**: p. 233-246.
68. Faubel, W., Heissler, S., Klewe-Nebenius, H., and Willin, H., *Zerstörungsfreie Analytik zur Überwachung von metallischen Kunstwerken und historischen Handschriften*, in *NACHRICHTEN-Forschungszentrum Karlsruhe Jahrg.35*. 2003: Karlsruhe. p. 202-206.
69. Faubel, W., *Blick durch die Patina*. Spectrum der Wissenschaft, 2000. **9**: p. 88-90.

70. Faubel, W., Staub, S., Simon, R., Heissler, S., Pataki, A., and Banik, G., *Non-destructive analysis for the investigation of decomposition phenomena of historical manuscripts and prints*. Spectrochimica Acta Part B, 2007. **62**: p. 669-676.
71. *Auswahl und Benutzung von Laser-Schutz- und Justierbrillen*, in BGI 5092. 2007. p. 85.
72. Faubel, W. and Schulz, T., *Photothermischer Sensor*. 1994.
73. Faubel, W. and Heissler, S., *Photothermisches Messsystem, europäische Patentanmeldung*. 2007.
74. Faubel, W., Gotter, B., Heißler, S., Schlegel, M., and Neubert, R.H.H., *Development of a photothermal double beam laser scanning system in biopharmaceutical applications*. J. Phys.: Conf. Ser., 2010. **214**(1): p. 1-5.
75. Megrab, N.A., Williams, A.C., and Barry, B.W., *Oestradiol permeation through human skin and silastic membrane: effects of propylene glycol and supersaturation*. J. Control. Release, 1995. **36**(3): p. 277-294.
76. Neubert, R. and Wohlrab, W., *In vitro methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulations*. Acta Pharm. Technol., 1990. **36**: p. 197-206.
77. Schendzielorz, A., Hanh, B.D., Neubert, R., and Wartewig, S., *Penetration Studies of Clotrimazole from Semisolid Formulation Using Step-Scan FT-IR Photoacoustic Spectroscopy*. Pharmaceutical Research, 1999. **16**(1): p. 42-45.
78. Schwarb, F.P., Imanidis, G., Schmith, E.W., Haigh, J.M., and Surber, C., *Effect of concentration and degree of saturation of topical flocinonide formulations of in vitro membrane transport and in vivo availability on human skin*. Pharm. Res., 1999. **16**: p. 909-915.
79. Twist, J.N. and Zatz, J.L., *Influence of dolvents on paraben permeation through idealised skin model membranes*. J. Soc. Cosmet. Chem., 1986. **37**: p. 429-444.
80. Houk, J. and Guy, R.H., *Membrane models for skin penetration studies*. Chem. Rev., 1988. **88**(3): p. 455-472.
81. Neubert, R., Bendas, C., Wohlrab, W., Gienau, B., and Furst, W., *A Multilayer Membrane System for Modeling Drug Penetration into Skin*. International Journal of Pharmaceutics, 1991. **75**(1): p. 89-94.
82. Fahr, A., van Hoogevest, P., May, S., Bergstrand, N., and Leigh, M.L.S., *Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: Consequences for drug delivery*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **26**: p. 251-265.
83. Fürst, W., Neubert, R., Richter, H., and Reppel, L., *Arzneimittelpermeation durch künstliche Lipidmembranen; 11. Mitteilung: Unterschiedliche membrantypen zur Anwendung in Permeationsmodellen*. Pharmazie, 1980. **35**: p. 120-121.
84. Ottaviani, G., Martel, S., and Carrupt, P.A., *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: A New Membrane for the Fast Prediction of Passive Human Skin Permeability*. J. Med. Chem., 2006. **49**(13): p. 3948-3954.
85. Tojo, K. and Lee, C., *A method for predicting steady state rate of skin penetration in vivo*. J. Invest. Dermatol., 1989. **92**: p. 105-108.
86. Hanh, B.D., *Anwendung von nicht-invasiven spektroskopischen Methoden zur Optimierung der Wirkstoffpenetration aus Suspensionen (Dissertation)*. 2001: Halle-Wittenberg. p. 47 - 50.
87. Manitz, R., Lucht, W., Strehmel, K., Weiner, R., and Neubert, R., *On Mathematical Modeling of Dermal and Transdermal Drug Delivery*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998. **87**(7): p. 873-879.
88. Bertram, J.E.A. and Gosline, J.M., *Functional Design of horse hoof keratin: the modulation of mechanical properties through hydration effects*. J. exp. Biol., 1987. **130**: p. 121-136.
89. Mertin, D. and Lippold, B.C., *In-vitro Permeability of the Human Nail and of a Keratin Membrane from Bovine Hooves: Prediction of the Penetration Rate of Antimycotics through the Nail Plate and their Efficacy*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1997. **49**: p. 866-872.
90. Walters, K.A. and Flynn, G.L., *Permeability characteristics of the human nail plate*. International Journal of Cosmetic Science, 1983. **5**: p. 231-246.
91. Pessoa, O., Cesar, C.L., Patel, N.A., Vargas, H., Ghizoni, C.C., and Miranda, L.C.M., *Two-beam photoacoustic phase measurement of the thermal diffusivity of solids*. J Appl Phys, 1986. **59**(4): p. 1316-1318.
92. Leite, N.F., Cella, N., Vargas, H., and Miranda, L.C.M., *Photothermal measurement of thermal diffusivity of polymer foils*. J Appl Phys, 1987. **61**(8): p. 3025-3027.

93. Balderas-López, J.A. and Mandelis, A., *Thermal diffusivity measurements in the photoacoustic open-cell configuration using simple signal normalization techniques*. J Appl Phys, 2001. **90**: p. 2273-2279.
94. Marinelli, M., Murtas, F., Mecozzi, M.G., Zammit, U., Pizzoferrato, R., Scudieri, S., Martellucci, S., and Marinelli, M., *Simultaneous determination of specific heat, thermal conductivity and thermal diffusivity at low temperature via the photopyroelectric technique*. Appl Phys A, 1990. **51**(5): p. 387-393.
95. Salazar, A., Sánchez-Lavega, A., and Fernández, J., *Theory of thermal diffusivity determination by the "mirage" technique in solids*. Journal of Applied Physics, 1989. **65**(11): p. 4150-4156.
96. Salazar, A., Sánchez-Lavega, A., Ocariz, A., Guitonny, J., Pandey, J.C., Fournier, D., and Boccara, A.C., *Novel results on thermal diffusivity measurements on anisotropic materials using photothermal methods*. Applied Physics Letters, 1995. **67**(5): p. 626-628.
97. Salazar, A. and Sanchez-Lavega, A., *Low temperature thermal diffusivity measurements of transparent solids and gases by the mirage technique*. Photoacoustic and Photothermal Phenomena, 1999. **463**: p. 324-326.
98. Sanchez-Lavega, A. and Salazar, A., *Thermal-Diffusivity Measurements in Opaque Solids by the Mirage Technique in the Temperature-Range from 300-K to 1000-K*. J Appl Phys, 1994. **76**(3): p. 1462-1468.
99. Parker, W.J., Jenkins, R.J., Butler, C.P., and Abbott, G.L., *Flash Method of Determining Thermal Diffusivity, Heat Capacity and Thermal Conductivity*. J Appl Phys, 1960. **32**(9): p. 1679-1684.
100. Ravi, J., Syamalakumari, B., Nandini, B., Nair, K.P.R., and Rasheed, T.M.A., *Mirage Detection Applied To Low Thermal Diffusivity Measurements of Weakly Absorbing Thermally Thin Plasma Polymerized Film*. Nondestructive Testing and Evaluation, 2002. **18**(3-4): p. 149-157.
101. Quelin, X., Perrin, B., Louis, G., and Peretti, P., *Three-dimensional thermal-conductivity-tensor measurement of a polymer crystal by photothermal probe-beam deflection*. Phys. Rev. Lett., 1993. **48**(6): p. 3677-3682.
102. Elias, P.M., Cooper, E.R., Korc, A., and Brown, B.E., *Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition*. J. Invest. Dermatol., 1981. **76**: p. 297-301.
103. Feldstein, M.M., Raigorodskii, I.M., Iordanskii, A.I., and Hadgraft, J., *Modeling of percutaneous drug transport in vitro using skin-imitating carbosil membrane*. J. Control. Release, 1998. **52**: p. 25-40.
104. Franz, T.J., *Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data*. J. Invest. Dermatol., 1975. **64**: p. 190-195.
105. Goates, C.Y. and Knutson, K., *Enhanced permeation of polar compounds through human epidermis. I: Permeability and membrane structural changes in the presence of short chain alcohols*. Biochim. Biophys Acta, 1994. **1195**: p. 169-179.
106. Harrison, J.E., Watkinson, A.C., Green, D.M., Hadgraft, J., and Brain, K., *The relative effect of Azone and Transcutol on permeant diffusivity and solubility in human stratum corneum*. Pharm. Res., 1996. **13**: p. 542-546.
107. Rastogi, S.K. and Singh, J., *Lipid extraction and transport of hydrophilic solutes through porcine epidermis*. Int. J. Pharm., 2001. **225**: p. 75-82.
108. Weigmann, H.J., Lademann, J., v Pelchrzim, R., Sterry, W., Hagemester, T., Molzahn, R., Schaefer, M., Lindscheid, M., Schaefer, H., and Shah, V.P., *Bioavailability of clobetasol propionate – quantification of drug concentrations in the stratum corneum by dermatopharmacokinetics using tape stripping*. Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol., 1999. **12**: p. 46-53.
109. Johnson, M.E., Berk, D.A., Blankschtein, D., Golan, D.E., Jain, R.K., and Langer, R.S., *Lateral diffusion of small compounds in human stratum corneum and model lipid bilayer systems*. Biophysical Journal, 1996. **71**(5): p. 2656-2668.
110. Johnson, M.E., Blankschtein, D., and Langer, R., *Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: Lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997. **86**(10): p. 1162-1172.
111. Schicksnus, G. and Müller-Goymann, C.C., *Lateral Diffusion of Ibuprofen in Human Skin during Permeation Studies*. Skin Pharmacol Physiol, 2004. **17**: p. 84-90.

112. Williams, A.C., Edwards, H.G.M., and Barry, B.W., *Raman-Spectra of Human Keratotic Biopolymers - Skin, Callus, Hair and Nail*. Journal of Raman Spectroscopy, 1994. **25**(1): p. 95-98.
113. Gotter, B., Faubel, W., Heißler, S., Hein, J., and Neubert, R.H.H., *Determination of drug content in semisolid formulations by non-invasive spectroscopic methods: FTIR – ATR, – PAS, – Raman and PDS*. Journal of Physics: Conference Series, 2010. **214**(1): p. 1-5.
114. Ashworth, J., Watson, W.S., and Finlay, A.Y., *The lateral spread of clobetasol 17-propionate in the stratum corneum in vivo*. Br. J. Pharmacol., 1988. **119**: p. 351-358.
115. Weigmann, H.J., Lademann, J., Schanzer, S., Lindemann, U., von Pelchrzim, R., Schaefer, H., Sterry, W., and Shah, V.P., *Correlation of the local distribution of topically applied substances inside the stratum corneum determined by tape-stripping to differences in bioavailability*. Skin Pharmacol. Physiol. Appl. Skin Physiol., 2001. **14**: p. 98-102.
116. Chambin-Remoussenard, O., Treffel, P., Bechtel, Y., and Agache, P., *Surface recovery and stripping methods to quantify percutaneous absorption of caffeine in humans*. J. Pharm. Sci. Vol. 82. 1993. p. 1099.
117. Jacobi, U., Wiegmann, H.-J., Baumann, M., Reiche, A.-I., and Sterry, W., *Lateral Spreading of Topically Applied UV Filter Substances Investigated by Tape Stripping*. Skin Pharmacol Physiol, 2004. **17**: p. 17-22.
118. Lieber, C.A. and Mahadevan-Jansen, A., *Development of a handheld Raman microspectrometer for clinical dermatologic applications*. OPTICS EXPRESS, 2007. **15**(19): p. 11874-11872.
119. Caspers, P.J., Lucassen, G.W., Wolthuis, R., Bruining, H.A., and Puppels, G.J., *In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin*. Biospectroscopy, 1998. **4**(5): p. S31-S39.
120. Caspers, P.J., Lucassen, G.W., Carter, E.A., Bruining, H.A., and Puppels, G.J., *In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: Noninvasive determination of molecular concentration profiles*. Journal of Investigative Dermatology, 2001. **116**(3): p. 434-442.
121. Caspers, P.J., Lucassen, G.W., and Puppels, G.J., *Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin*. Biophysical Journal, 2003. **85**(1): p. 572-580.
122. Chrit, L., Bastien, P., Sockalingum, G.D., Batisse, D., Leroy, F., Manfait, M., and Hadjur, C., *An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: Assessment of a glycerol-based hydration cream*. Skin Pharmacology and Physiology, 2006. **19**(4): p. 207-215.
123. de Faria, D.L.A. and de Souza, M.A., *Raman spectra of human skin and nail excited in the visible region*. Journal of Raman Spectroscopy, 1999. **30**(3): p. 169-171.
124. Schallreuter, K.U., Moore, J., Behrens-Williams, S., Panske, A., and Harari, M., *Rapid initiation of repigmentation in vitiligo with Dead Sea climatotherapy in combination with pseudocatalase (PC-KUS)*. International Journal of Dermatology, 2002. **41**: p. 482-487.
125. Gotter, B., Faubel, W., and Neubert, R.H.H., *Photothermal imaging for 3 D surface analysis for membrane drug delivery*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2010. **74**(1): p. 26-32.
126. Lin-Vien, D., Colthup, N.B., Fateley, W.G., and Grasselli, J.G., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. 1 ed. 1991, San Diego: Academic Press. p. 503.
127. Arbiser, J.L., Klauber, N., Rohan, R., van Leeuwen, R., Huang, M.T., Fisher, E., Flynn, E., and Byers, H.R., *Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis*. Mol. Med., 1998. **4**(6): p. 376-383.
128. Huang, M.T., Newmark, H.L., and Frenkel, K., *Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice*. J. Cell. Biochem., 1997. **67**(27): p. 26-34.
129. Phan, T.T., See, P., Lee, S.T., and Chan, S.Y., *Protective Effects of Curcumin against Oxidative Damage on Skin Cells In Vitro: Its Implication for Wound Healing*. J. Traum. Inj. Inf. Cri. Car., 2001. **51**(5): p. 927-931.
130. Lademann, J., Richter, H., Otberg, N., Lawrenz, F., Blume-Peytavi, U., and Sterry, W., *Application of a Dermatological Laser Scanning Confocal Microscope for Investigation in Skin Physiology*. Laser Physics, 2003. **13**(5): p. 746-760.
131. Otberg, N., Richter, H., Knuttel, H., Schaefer, H., Sterry, W., and Lademann, J., *Laser spectroscopic methods for the characterization of open and closed follicles*. Las. Phys. Let., 2004. **1**(1): p. 46-49.

132. Teichmann, A., Heuschkel, S., Jacobi, U., Gaele, P., Neubert, R., Sterry, W., and Lademann, J., Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2007. 67(3): p. 699-706.
133. Schlegel, M., Erprobung der Photothermischen Strahlableitung zur Bestimmung der Schichtdicken und Temperaturleitfähigkeiten von Werkstoffen einer Ersatzzelle für Li-Ionen Batterien, in Institut für Thermische Verfahrenstechnik. 2010, KIT: Karlsruhe. p. 82.
134. Dietrich, B., Schlegel, M., Heißler, S., Kind, M., and Faubel, W., Determination of thermal diffusivity of ceramics by means of photothermal beam deflection. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2010. 214(1): p. 1-5.
135. Brown, S.M., Baesso, M.L., Shen, J., and Snook, R.D., Thermal diffusivity of skin measured by two photothermal techniques. *Analytica Chimica Acta*, 1993. 282: p. 711-719.
136. Dias, D.T., Nuglish, L.E.R., Sehn, E., Baesso, M.L., Medina, A.N., and Bento, A.C., Human nail thermal diffusivity obtained using the open photoacoustic cell technique. *Journal de Physique IV*, 2005. 125: p. 657-660.
137. Rodriguez, G.P., Arenas, A.C., Hernandez, R.A.M., Stolik, S., Orea, A.C., and Sinencio, F.S., Measurement of thermal diffusivity of bone, hydroxyapatite and metals for biomedical application. *Analytical Sciences*, 2001. 17: p. 357-360.
138. Zhang, S.L., Caspers, P.J., and Puppels, G.J., In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Effect of Skin Care Products on Molecular Concentration Depth-Profiles. *Microsc Microanal*, 2005. 11(2): p. 790-791.
139. Zhang, G., Moore, D.J., Sloan, K.B., Flach, C.R., and Mendelsohn, R., Imaging the Prodrug-to-Drug Transformation of a 5-Fluorouracil Derivative in Skin by Confocal Raman Microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007. 127: p. 1205-1209.
140. Chrit, L., Hadjir, C., Morel, S., Sockalingum, G., Lebourdon, G., Leroy, F., and Manfait, M., In vivo chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe. *Journal of Biomedical Optics*, 2005. 10(4).
141. Xiao, C., Flach, C.R., Marcott, C., and Mendelsohn, R., Uncertainties in Depth Determination and Comparison of Multivariate with Univariate Analysis in Confocal Raman Studies of a Laminated Polymer and Skin. *Applied Spectroscopy*, 2004. 58(4): p. 382-389.
142. Gotter, B., Faubel, W., and Neubert, R.H.H., FTIR microscopy and confocal Raman microscopy for studying lateral drug diffusion from a semisolid formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2010. 74(1): p. 14-20.
143. Lahjomri, F., Benamar, N., Chatri, E., and Leblanc, R.M., Study of the Diffusion of some Emulsions in the Human Skin by Pulsed Photoacoustic Spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 2003. 48: p. 2729-2738.
144. Lahjomri, F., Puccetti, G., Leblanc, R.M., Alard, V., Denis, A., and J.F., T., Pulsed Photoacoustic Study of the Diffusion of Chromophores in Human Skin. *J. Photochemistry and Photobiology*, 1997. 65(2): p. 292-302.
145. Barja, P.R. and Veloso, D.J.D.V., Photoacoustic study of the penetration kinetics of nimesulid into human skin. *Journal of Physics: Conference Series*, 2010. 214: p. 1-4.
146. Christ, A., Szurkowski, J., Hanh, B.D., Wartewig, S., Kopycinska, M., Neubert, R.H.H., and Cobet, U., Drug penetration into a membrane investigated by photoacoustic and FTIR-ATR spectroscopy. *Analytical Sciences*, 2001. 17: p. 371-S373.
147. Bodzenta, J., Hanh, B.D., Kázmierzack, A., Neubert, R.H.H., and Wartewig, S., Investigation of ketoconazole diffusion into collodion membranes using step-scan FTIR-PAS technique. *Journal de Physique IV*, 2004. 117: p. 13-16.
148. Xiao, P., Ciorrea, L.I., Singh, H., Cui, Y., Berg, E.P., and Imhof, R.E., Opto-thermal in-vivo skin hydration measurements – a comparison study of different measurement techniques. *Journal of Physics: Conference Series*, 2010. 214: p. 1-4.
149. Xiao, P., Cowen, J.A., and Imhof, R.E., In-Vivo Transdermal Drug Diffusion Depth Profiling - A New Approach to Opto-Thermal Signal Analysis. *J. Analyt. Sci.*, 2001. 17: p. 349-352.
150. Bindra, R.M.S., Eccleston, G.M., Imhof, R.E., and Birch, D.J.S., Optothermal In vivo Monitoring of Human Skin Condition. Prediction of Percutaneous Penetration : Methods, Measurements, Modelling, Vol 2, 1991: p. 628-635.

151. Bindra, R.M.S., Imhof, R.E., Eccleston, G.M., and Birch, D.J.S., Monitoring Changes in Skin Condition Due to the Application of DmsO, Using an Optothermal Technique. Proceedings of Laser Surgery : Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems III, 1992. 1643: p. 299-309.
152. Bindra, R.M.S., Imhof, R.E., and Eccleston, G.M., In-Vivo Optothermal Measurement of Epidermal Thickness. Journal De Physique Iv, 1994. 4(C7): p. 445-448.
153. Bindra, R.M.S., Imhof, R.E., Mochan, A., and Eccleston, G.M., Optothermal Technique for in-Vivo Stratum-Corneum Hydration Measurement. Journal De Physique Iv, 1994. 4(C7): p. 465-468.
154. Xiao, P., Cowen, J.A., and Imhof, R.E., In-Vivo Transdermal Drug Diffusion Depth Profiling - A New Approach to Opto-Thermal Signal Analysis. ANALYTICAL SCIENCES APRIL 2001, VOL.17 Special Issue, 2001. 17: p. 349-352.
155. Notinger, I. and Imhof, R.E., Mid-infrared in vivo depth-profiling of topical chemicals on skin. Skin Research and Technology, 2004. 10(2): p. 113-121.
156. Plamann, K., Giese, K., Sennhenn, B., Harendt, N., and Kölmel, K., In vivo evaluation of the human skin permeation of topically applied light absorbing agents by a mirage effect spectrometer, in Photoacoustic and Photothermal Phenomena III. 1992, Springer Verlag: Berlin. p. 92-94.
157. Power, J.F., Fu, S.W., and Schweitzer, M.A., Depth Profiling of Optical Absorption in Thin Films via the Mirage Effect and a New Inverse Scattering Theory. Part I: Principles and Methodology. Appl Spectrosc, 2000. 54(1): p. 110-126.
158. Power, J.F., Nepotchatykh, O.V., and Fu, S.W., Evaluation of Mirage Effect Spectrometry for Optical Absorption Depth Profiling of Photodegradation in Thin Poly(vinylchloride) Films. Appl Spectrosc, 2000. 54(12): p. 1782.

7. Anhang

7.1. Dokumentation zum Scannersystem für die Thermische Linse Oberflächenprüfung

Autor:

Microcontrollerbasierte
Mess-, Steuer- und Regelungstechnik
Dipl.-Ing. (FH) Martin Mensch
Gudrunstr. 7
76 227 Karlsruhe
martin.mensch@mm-uC-systems.de
Bearbeitungszeitraum:
März 2008 bis Mai 2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	110
2 Justage	110
2.1 Justage der Detektoreinheit	100
2.2 Synchronisation Scanner - Limes-Achse	111
3 Bedienung der Software	112
3.1 Start	112
3.2 Übersicht	112
3.3 Die Flächenmessung	112
3.3.1 Ablauf einer Messung	113
3.3.1.1 Registerkarte „allgemein“	113
3.3.1.2 Registerkarte „Kommentar“	113
3.3.1.3 Registerkarte „Grundeinstellungen“	113
3.3.1.4 Registerkarte „Geräteparameter“	113
3.3.1.5 Registerkarte „Probenparameter“	114
3.3.1.6 Registerkarte „Position anfahren“	115
3.3.1.7 Registerkarte „Start / Stopp“	115
3.3.1.8 Registerkarte „Darstellung“	116
3.4 Die Zero-Crossing-Messung	116
3.4.1 Ablauf einer Messung	116
3.4.1.1 Registerkarte „Zero Crossing Parameter“	116
3.4.1.2 Registerkarte „Position anfahren“	117
3.4.1.3 Registerkarte „Start / Stopp“	117
3.5 Die Einpunktmessung	118
3.5.1 Ablauf einer Messung	118
3.5.1.1 Registerkarte „Messungsparameter“	118
3.5.1.2 Registerkarte „Position anfahren“	119
3.5.1.3 Registerkarte „Start / Stopp“	119
3.5.1.4 Registerkarte „Darstellung“	119
3.6 Ansehen gespeicherter Messdaten	119
3.7 Konfigurationen speichern und laden	120
4 Dateiformat der Messdatendateien	120
4.1 Messdatenformat Flächenmessung	120
4.2 Messdatenformat Zero-Crossing-Messung	120
4.3 Messdatenformat Einpunktmessung	121

1 Einleitung

Mit dem Scannersystem zur Oberflächenprüfung nach dem Thermische Linse Verfahren steht eine Anlage zur Verfügung, deren Funktion von der zu messenden Probe weitgehend unabhängig ist, das heißt, die Probe muss nicht in die Apparatur eingesetzt werden, sondern kann von außen an sie angelegt werden. Dadurch können verschiedenste Proben unterschiedlicher Größe und Art vermessen werden.

Diese Eigenschaft wird erreicht durch ein Scannersystem, das den Anregungslaserstrahl auf der Probe positioniert. Der Detektionslaserstrahl wird gleichzeitig mit einer motorischen Verschiebeeinheit entsprechend positioniert. So kann die Probe unbewegt vor der Apparatur befestigt werden. Diese Dokumentation beschreibt die Einrichtung der Apparatur und die Bedienung der PC-gestützten Bedien- und Visualisierungssoftware.

2 Justage

2.1 Justage der Detektoreinheit

Der eigentliche PSD-Detektor bzw. Lateraldiode liegt hinter einem Rotfilter zur Streulichtreduktion. Daher kann man nicht rein optisch den Laser optimal auf den Detektor positionieren. Mit den folgenden Schritten sollte eine Justage mit Hilfe der analogen Ausgangssignale einfach möglich sein. Diese Analogsignale sind das Summen- und das Differenzsignal der Signale von den beiden Enden des PSD (jeweils elektronisch aufbereitet). Das Summensignal folgt (unter normalen Betriebsbedingungen) der Lichtintensität, die auf den PSD fällt. Das Differenzsignal ist abhängig von der Position des Laserstrahls in axialer Richtung auf dem PSD. Die Achse des PSD verläuft parallel zur kurzen Seite des Detektorkopfgehäuses, also hier in senkrechter Richtung. Die analogen Ausgangssignale sind an zwei BNC-Buchsen des Gehäuses der Elektronikhaupteinheit zugänglich, sie befinden sich auf der Seite des Gehäuses, an der der Detektorkopf angeschlossen wird (RJ45-Buchse). Die BNC-Buchse, die direkt neben der RJ45-Buchse liegt, gibt das Differenzsignal aus, die zweite das Summensignal. Die Spannungen können maximal $\pm 5V$ betragen.

Schrittweise Justage:

- der Detektorkopf muss so eingebaut werden, dass eine thermische Linse den Laserstrahl in axialer Richtung des PSD auslenkt
- die elektrischen Anschlüsse werden richtig angeschlossen
- die Versorgung wird eingeschaltet
- der Detektionslaserstrahl wird in etwa mittig auf dem Rotfilter ausgerichtet
- am Summensignal wird beobachtet, ob der Laserstrahl schon auf den PSD fällt, indem man den Detektionsstrahlengang unterbricht und das Signal beobachtet.
- wenn dabei keine Änderung des Signals zu sehen ist und der Spannungswert nur wenige mV beträgt, dann muss der Laserstrahl erst noch grob auf den PSD justiert werden
- dazu vorzugsweise senkrecht zur axialen PSD-Richtung verstellen und dabei prüfen, ob man ein Signal erhält. Ggf. auch axial verstellen. In einem Feld von max 5 x 5 mm um die Mitte des Rotfilter sollte ein Signal zu finden sein
- bei vorhandenem PSD-Signal nun senkrecht zur axialen PSD-Richtung in beide Richtungen soweit verstellen, bis das Signal anfängt zu verschwinden, jeweils die Position merken. Dann die Mitte zwischen diesen Positionen einstellen. Der Laserstrahl befindet sich nun auf der Mittelachse des PSD.
- in axialer Richtung verstellen, bis das Differenzsignal 0 anzeigt. In einer Richtung sollte nun ein positives, in der anderen ein negatives Differenzsignal ausgegeben werden.
- nochmal die Ausrichtung auf der Achse einstellen, indem senkrecht zur Achse zwischen die beiden Punkte, an denen das Signal verschwindet, positioniert wird.

- nun muß noch die Lichtintensität des Detektionslaserstrahls eingestellt werden. Diese sollte so hoch wie möglich sein, ohne dass der PSD übersteuert wird. Übersteuerung zeigt sich dadurch, dass das Summensignal an verschiedenen axialen Positionen nicht konstant bleibt. Beim Verfahren des Detektionslaserstrahls in axialer Richtung darf das Summensignal zwischen den beiden axialen Endpunkten, an denen das Signal ganz zu verschwinden beginnt, nicht mehr als 1% (noch genau festzulegen) schwanken. Wenn doch, muss die Laserleistung reduziert werden. Das Summensignal darf nicht mehr als 2,5 Volt betragen.
- Für eine zuverlässige Messung ist wichtig, dass das Differenzsignal keinen Offset hat. Das heißt, das Differenzsignal muss, wenn keine Thermische Linse vorliegt, null sein. Ein Weglaufen der Nulllinie im Verlauf längerer Messungen muss korrigiert werden.

2.2 Synchronisation Scanner - Limes-Achse

Um über das gesamte Probenfeld einheitliche Messbedingungen zu haben, müssen die Scannereinheit, die den Anregungslaserstrahl positioniert und die Limes-Achse, die den Detektionslaserstrahl positioniert, synchronisiert werden. Da die Positionierungsauflösung des Detektionslaserstrahls über die mechanischen Elemente der Limes-Achse fest eingestellt und kalibriert ist, während die Positionierungsauflösung des Anregungslaserstrahls vom Abstand Scanner - Probe abhängig ist, wird zur Synchronisierung in die Positionierparameter des Anregungslaserstrahls eingegriffen. Es wird in der Registerkarte „Geräteparameter“ die Positionierauflösung in μm eingegeben, d.h. die kleinst mögliche Schrittweite, um die der Anregungslaserstrahl versetzt werden kann. Dieser Wert muss so gewählt werden, dass die relative Position von Anregungslaserstrahl und Detektionslaserstrahl über der gesamten Probenfläche unverändert bleiben. Für x- und y-Richtung sollte derselbe Wert eingestellt werden, für die Synchronisierung wichtig ist aber nur der y-Wert. Als Startwert eignet sich $0,5\mu\text{m}$ bei einem Abstand Scannerspiegel zu Probe von ca. 16 cm. Um die Größe praktisch einzustellen, muss man iterativ vorgehen. Es wird dazu eine Probe benötigt, die über die gesamte zu messende Fläche bezüglich ihrer photothermischen Eigenschaften homogen ist.

Ablauf der Synchronisation:

- Zunächst befindet sich die Limes-Achse, die den Detektionslaserstrahl positioniert, nach dem Herstellen der Verbindung auf der Registerkarte „Grundeinstellungen“ in einer mittleren Position.
- Der Anregungslaserstrahl wird durch Verdrehen des Scannerspiegels für die senkrechte Position in seiner Halterung (der gesamte Galvomotor, **NICHT** nur der eigentliche Spiegel !!) in erster Näherung zur Deckung mit dem Detektionslaserstrahl gebracht.
- Eine genauere Deckung kann nun mit den Verfahrbuttons auf der Registerkarte „Position anfahren“ hergestellt werden. Dabei ist zu beachten, dass die linken vertikalen Buttons Anregungslaserstrahl und Detektionslaserstrahl verfahren, während die rechten vertikalen Buttons nur den Detektionslaserstrahl verfahren.
- Nun wird ein maximales Thermische-Linse-Signal eingestellt und mit dem Oszilloskop überwacht.
- Der Versatz zwischen Anregungslaserstrahl und Detektionslaserstrahl wird mit dem entsprechenden Button null gesetzt.
- Beim Verfahren von Anregungslaserstrahl und Detektionslaserstrahl auf der Probe (linke vertikale Buttons) wird beobachtet, ob sich das thermische Linse Signal verändert. Tritt eine deutliche Änderung ein, so ist diese wegen der Homogenität der Probe auf eine relative Bewegung zwischen Anregungslaserstrahl und Detektionslaserstrahl zurückzuführen. Um kleinere Inhomogenitäten auszugleichen, kann man in regelmäßigen Abständen mit den rechten Buttons erneut das Maximum der Thermischen Linse suchen und den Versatz bei weiterem Verfahren mit den linken Buttons stehen lassen.

- Mit den rechten Buttons wird nun am Ende der Verfahrstrecke nur der Detektionslaserstrahl so verschoben, dass wieder das Maximum der Thermischen Linse eingestellt ist. Es muss natürlich auch die gleiche Hälfte der thermischen Linse gemessen werden.

- Nun wird aus den Größen

- aktuell eingestellte Positionierauflösung des Anregungslaserstrahls ds_{alt}

- gefahrener Gesamtweg s

- Versatz des Detektionslaserstrahls d

die neue einzusetzende Positionierauflösung ds_{neu} berechnet:

$$ds_{neu} = ds_{alt} * s / (s - d)$$

die Vorzeichen von s und d müssen beachtet werden !!

- Dieses Vorgehen wird so oft wiederholt, bis keine Änderungen mehr nötig sind.

- Eine abschließende Prüfung des Ergebnisses kann dadurch erfolgen, dass eine möglichst große Fläche der homogenen Probe gescannt wird. Dabei sollten sich für Amplitude und Phase ebene, waagrecht liegende Flächen ergeben. Dies setzt allerdings eine besonders gute Homogenität der Probe voraus.

3 Bedienung der Software

3.1 Start

Zum Starten der Software wird auf die Datei TL_Scanner_Limes.exe bzw einen entsprechenden Desktoplink doppelgeklickt.

3.2 Übersicht

Die Benutzeroberfläche des Programms besteht aus drei Bereichen: oben befindet sich das Menü, darunter der große Bereich zur Darstellung der Messwerte und unten in verschiedenen Registerkarten die Einstellmöglichkeiten der Parameter. Da die Bereiche unterschiedliches Aussehen und Funktion haben, je nach Art der durchgeführten Messung, werden im Folgenden die Abläufe für die einzelnen Messmethoden beschrieben und dabei auf die konkrete Bedienung der jeweiligen Elemente eingegangen.

3.3 Die Flächenmessung

Zweck der Flächenmessung ist, die räumliche Verteilung des Thermische-Linse-Signals auf einer flächigen Probe zu ermitteln. Dazu wird die Probe vom System abgescannt und die Messergebnisse für jeden Punkt gemessen und in einem entsprechenden Diagramm dargestellt. Dieses Diagramm ist ein 3D-Diagramm, dass in seiner Grundfläche die Probe wiedergibt und in der Hochachse die Signalhöhe darstellt. Da es zwei Messsignale gibt, Amplitude und Phase, werden auch zwei 3D-Diagramme dargestellt, die synchron mit Messwerten entsprechend dem Scanfortschritt befüllt werden. Links wird die Amplitude aufgetragen, rechts die Phase.

Bedienung der Diagramme:

Beim Eintritt in die Diagrammfelder wird der Mauszeiger zu einer Hand. Hält man so die linke Maustaste gedrückt, und bewegt den Mauszeiger, so dreht sich die Box mit und man kann den Blickwinkel auf die Datenfläche ändern. Eine spezielle Ansicht, von oben auf die Datenfläche, erhält man durch Klicken auf den Button „2D“ unter dem jeweiligen Diagramm. Zurück zur variablen 3D-Ansicht durch Klicken auf den Button „3D“.

Fährt man mit dem Mauszeiger über die Datenfläche, so werden unter dem entsprechenden Diagramm die Werte des

Messpunktes, auf den der Finger zeigt, dargestellt: X-, Y- und Z-Koordinate und die Zeit, zu der der Messpunkt aufgenommen wurde.

3.3.1 Ablauf einer Messung

Für eine Flächenmessung muss im Menü „Modus“ „Flächenmessung“ ausgewählt sein. Nun können auf den Registerkarten die nötigen Einstellungen durchgeführt werden. Am besten geht man die Registerkarten von links nach rechts durch und macht die Einstellungen entsprechend der gewünschten Messung. Mit der Tabulatortaste kann man die Felder, auf denen Einstellungen gemacht werden können, einfach der Reihe nach anspringen.

3.3.1.1 Registerkarte „allgemein“

Geben Sie den Titel der Messung und den Bearbeiter an. Diese Angaben dienen nur zur Information und werden mit den Messwerten gespeichert.

Die Startzeit der Messung wird vom System automatisch vergeben und kann nicht verändert werden. Tragen Sie bei „Datei für Messdaten“ einen Dateinamen ein oder wählen Sie eine Datei durch klicken auf „auswählen“ aus. Die Einstellung des Dezimalzeichens, Komma oder Punkt, wirkt sich auf die Darstellung der gespeicherten Messwerte aus. Je nach Programm, bzw. Ländereinstellung des PC, mit dem die Daten später weiterverarbeitet werden sollen, muss die richtige Einstellung gewählt werden.

3.3.1.2 Registerkarte „Kommentar“

Geben Sie einen Kommentar Ihrer Wahl ein, er dient nur zur Information und wird mit den Messwerten gespeichert. Der Kommentar kann auch während laufender Messungen geändert werden. Allerdings muss dann die Messung nach Ende der Messung erneut von Hand gespeichert werden.

3.3.1.3 Registerkarte „Grundeinstellungen“

Wählen Sie die Schnittstellen, an denen die Elektronikhaupteinheit bzw die Limes-Achse angeschlossen sind und stellen Sie mit den Buttons die Verbindung her. Wenn Sie nicht sicher sind, an welcher Schnittstelle was angeschlossen ist, müssen Sie die Möglichkeiten durchprobieren. Beginnen Sie dazu mit der Limes-Achse. Wenn Sie die Anschlüsse nicht verändern, werden bei erneutem Programmstart die alten Werte beibehalten.

3.3.1.4 Registerkarte „Geräteparameter“

Wählen Sie die Chopperfrequenz (zulässige Werte = 4,0 bis 100,0 Hz)

Wählen Sie Einstellungen, die das Hardware-Verhalten beeinflussen:

- Verstärkung Vorverstärker:

Die Verstärkung des Vorverstärkers im Detektorkopf kann in Schritten von $\sqrt{10}$ eingestellt werden. Bitte bedenken Sie, dass hohe Verstärkung auch das Rauschen erhöht, es sollte daher ein möglichst hohes Signal bei möglichst niedriger Verstärkungsstufe angestrebt werden.

- Pos.-Auflösung X und Y:

Der Wert gibt an, wie viel μm Versatz auf der Probe eine kleinstmögliche Winkelverstellung des Scanners bewirkt. Der Wert wird für die Synchronisation der Limes-Achse mit dem Scanner verwendet. Zur Ermittlung der Werte siehe Kapitel „Synchronisation Scanner - Limes-Achse“. Für X und Y sollte derselbe Wert eingetragen werden. Eine Änderung dieser Werte führt zum Beenden der Verbindungen zur Elektronikhaupteinheit und zur Limes-Achse, so dass eine Neuinitialisierung dieser beiden durchgeführt werden muss.

- Chopperperioden pro Messung:

Der Wert gibt an, über wieviele Chopperperioden gemittelt wird, um einen Messpunkt aufzunehmen (zulässige Werte = 1 bis 100). Je größer der Wert, umso länger dauert eine Messung, aber umso mehr wird Rauschen unterdrückt. Die Berechnung der Messwerte berücksichtigt diese Ein-

stellung, so dass sie auf die Höhe der Counts der Messungen keinen Einfluss hat. Es ist also nur ein Einfluss auf das Rauschen vorhanden. Ein höherer Wert erhöht auch die Empfindlichkeit gegen Abweichungen der Chopperfrequenz. Ist der Chopper nicht richtig stabil, können so Ausreißerwerte entstehen. Es muss also abgewägt werden zwischen den Bedürfnissen an das Signal-Rauschverhältnis, der Messzeit und der Empfindlichkeit bzgl der Chopperstabilität.

3.3.1.5 Registerkarte „Probenparameter“

Hier wird das Probenfeld spezifiziert:

- Startposition X und Y gibt die Startecke in Bezug auf die aktuelle Position des Nullpunktes an. Alternativ kann die Startecke in der Registerkarte „Position anfahren“ gewählt werden. Bei einer senkrecht stehenden Probe und Blick aus Richtung des Anregungslaserstrahl befindet sich der Startpunkt unten links.
- Gesamtweg X und Y gibt die Dimension des Probenfeldes an. Alternativ können die Dimensionen durch Wahl eines Endpunkts in der Registerkarte „Position anfahren“ gewählt werden.
- Schrittweite X und Y wählt die räumliche Auflösung der Messung. Es sind minimal 2x2 Messpunkte möglich.
- Wartezeit an Messpunkt gibt an, wieviel Zeit nach Anfahren einer neuen Messposition und vor Beginn der Messung gewartet werden soll. In dieser Zeit kann sich die Thermische Linse und deren elektronisches Messsignal stabilisieren. Eine geeignete Wahl dieses Wertes ist von verschiedenen Parametern abhängig wie zB der Gleichmäßigkeit der Probe.
- Zeit pro Scan zeigt die voraussichtliche Dauer eines Scans des Probenfeldes mit den eingestellten Werten an. Der Wert ist gültig, wenn im zuletzt geänderten Feld „Return“ gedrückt wurde oder wenn der Fokus vom zuletzt geänderten Feld entfernt wird, dh. wenn in ein anderes Feld geklickt wird oder die Tabulatortaste gedrückt wurde.

Hier ist keine Eingabe möglich.

- Im Bereich „mehrere Chopperfrequenzen“ kann eine (ein- oder mehrmalige) Wiederholung des Scans mit einer geänderten Chopperfrequenz gewählt werden. Jeder neue Scan wird in eine eigene Datei abgespeichert.
- Anzahl wählt die Anzahl der Scans, dh. Eintrag = 1 bedeutet keine Wiederholung
- Delta Chopperfreq wählt die Änderung der Chopperfrequenz.
- Im Bereich „mehrere Scans“ kann eine (ein- oder mehrmalige) Wiederholung des Scans incl. Chopperschleifen gewählt werden. Jeder neue Scan wird in eine eigene Datei abgespeichert.
- Anzahl wählt die Anzahl der Scans, dh. Eintrag = 1 bedeutet keine Wiederholung
- Periode gibt die Periode der Wiederholungen an. Wenn ein Scan inclusive Chopperschleifen länger als die Periode dauert wird sofort der nächste Scan gestartet.
- Ruheposition bestimmt einen Punkt, an dem der Anregungsstrahl platziert wird, wenn nach abgeschlossenem Scan auf den Ablauf der Periode zum Start des nächsten Scans gewartet wird. Der Wert ist als Entfernung in negativer x- und y-Richtung vom Startpunkt zu verstehen.
- Bei Laserleistung kann ein Wert zur Dokumentation eingegeben werden, als Beispiel:
mehrere Chopperfrequenzen: Anzahl = 3; Delta Chopperfrequenz = 2 Hz
mehrere Scans: Anzahl = 2, Periode = 30 min, Ruheposition = 2 mm
Registerkarte Geräteparameter: Chopperfrequenz = 10Hz

ergibt folgenden Ablauf:

- Zeit = 0
- Scan mit 10 Hz
- Scan mit 12 Hz
- Scan mit 14 Hz
- fahren an Ruheposition bei -2 mm / -2 mm vom Startpunkt aus
- warten, bis Zeit = 30 min, ggf sofort weiter

- Scan mit 10 Hz
- Scan mit 12 Hz
- Scan mit 14 Hz

3.3.1.6 Registerkarte „Position anfahren“

Hier kann die Position des Messpunktes auf der Probe verfahren werden und die relative Position des Detektionslaserstrahls zum Anregungslaserstrahl geändert werden. Um die Aktivitäten ausführen zu können, muss eine Verbindung zur Messelektronik und zur Limes-Achse bestehen. Wenn eine dieser Verbindungen nicht besteht, wird nicht die Registerkarte „Position anfahren“ gezeigt, sondern es wird zur Registerkarte „Grundeinstellungen“ gesprungen.

Die Pfeilbuttons in Kreuzanordnung ändern die Position des Messpunktes bei gleichbleibender relativer Position Anregungsstrahl zu Detektionsstrahl. Das bedeutet, in vertikaler Richtung verfahren Anregungs- und Detektionsstrahl, während in horizontaler Richtung nur der Anregungsstrahl verfährt (und zwar in Strahlrichtung des Detektionsstrahls). Im Feld „aktuelle Position“ wird die aktuelle Position mit Bezug auf den zuletzt gewählten Nullpunkt angezeigt. Wird der Button „=> Startposition“ gedrückt, so wird die aktuelle Position als Startposition für die Messung gesetzt und die entsprechenden Einträge in der Registerkarte „Probenparameter“ geändert. Ist die Probe neu, d.h es besteht kein Bezug zur vorherigen Messung, so wird die aktuelle Position gleichzeitig als Nullpunkt gesetzt. Besteht ein Bezug zur vorherigen Messung, also es soll zB ein Ausschnitt der vorherigen Messung gemessen werden, dann bleiben die Positionskoordinaten unverändert. Wird der Button „=> Endposition“ gedrückt, so wird die aktuelle Position als Endposition für die Messung gesetzt. Mit Bezug auf die Startposition werden die Dimensionen der Probe in der Registerkarte „Probenparameter“ geändert Die Pfeilbuttons in vertikaler Anordnung ändern nur die Position des Detektionsstrahls dh es wird nur die Limes- Achse verfahren. Das Feld „Versatz“ zeigt die relative Position zum Anregungsstrahl an. Der Wert des Versatzes kann mit dem entsprechenden Button zu null gesetzt werden. Mit der Änderung der relativen Position des Detektionsstrahls zum Anregungsstrahl kann die optimale Stellung für die Messung der thermischen Linse gefunden werden. Die zwei Zeigerinstrumente dienen als Hilfe bei der Einstellung einer thermischen Linse. Sie können auch alternativ für die auf einem Oszilloskop darstellbaren Signale Summensignal und Differenzsignal verwendet werden (die zur Justage notwendige Einstellung von DC-Anteil des Differenzsignal = 0 geht mit dem Amplitudenwert aber nicht !). Links wird die Gesamtintensität des auf den Detektor fallenden Laserlichts in mV angezeigt. Dies entspricht dem Summensignal. Hier darf ein Maximalwert von 2500mV nicht überschritten werden. Andererseits sollte der Wert so groß wie möglich sein, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen Rechts wird die Amplitude des Messsignals in Counts angezeigt. Hier kann abgelesen werden, wie stark eine thermische Linse an der Position des Detektionsstrahls aktuell ist. Mit den Buttons unter den Instrumenten kann deren Messbereich umgeschaltet werden.

3.3.1.7 Registerkarte „Start / Stopp“

Hier erfolgt der Start und Stopp einer Messreihe und die Anzeige des Fortschritts

Nach kompletter Einstellung der Parameter kann mit Start die Messreihe gestartet werden. Es erfolgt eine Abfrage, ob Einstellungen, die nicht von der Software vorgenommen werden können, richtig gesetzt wurden. Bei laufender Messung zeigt der obere Fortschrittsbalken den Fortschritt des aktuellen Scans an, der untere den der gesamten Messung. Während der Messung wird unter den Diagrammen die aktuelle Messposition sowie die aktuelle Aktivität des Systems angezeigt. Die Registerkarten sind für Eingaben gesperrt, außer „Kommentar“ und „Darstellung“. Die Messreihe kann jederzeit mit Stopp abgebrochen werden. Nach regulärem Ende oder Abbruch einer Messung sind die beiden Buttons „neue Messung mit gleicher Probe“ und „neue Messung mit neuer Probe“ freigegeben. „Neue Messung mit gleicher Probe“ bedeutet, dass die Probenposition

der nächsten Messung sich auf die der gerade beendeten bezieht, also es soll zB ein Ausschnitt der vorherigen Messung gemessen werden. Eine entsprechende Information wird mit den Messdaten gespeichert. „Neue Messung mit neuer Probe“ bedeutet, dass die nächste Messung unabhängig von der gerade beendeten ist.

3.3.1.8 Registerkarte „Darstellung“

Hier kann das Aussehen der 3D-Diagramme für Amplituden- und Phasenmesswerte geändert werden. Man kann die Rahmenart der Box ändern und die Gitterlinien auf der Messwertefläche ein- oder ausschalten. Für jedes Diagramm kann man die Grenzen der z-Achse (z-Maximum, z-Minimum) einstellen und die farbliche Darstellung der Messwerte verändern. Dabei wird einem oberen (für $z >$) und einem unteren (für $z <$) Wert und dem Mittelwert der beiden je eine Farbe zugeordnet. Die Farben lassen sich nach eigenen Bedürfnissen ändern. Messwerte zwischen diesen Werten erhalten den jeweils interpolierten Farbwert. Es ergibt sich eine Darstellung mit Farbverläufen entsprechend der Höhe der Fläche, mit der die gewünschten Bereiche optimal hervorgehoben werden können. Am besten stellt man die Werte, insbesondere z-Maximum und den oberen Wert für die Farbgebung ein, wenn fest steht, in welchem Bereich sich die Messwerte bewegen und welcher Bereich von Interesse ist.

3.4 Die Zero-Crossing-Messung

Zweck der Zero-Crossing-Messung ist, die thermische Linse schrittweise mit dem Detektionslaserstrahl zu durchfahren und dabei dessen Ablenkung zu messen. Der Anregungslaserstrahl bleibt dabei auf demselben Punkt der Probe und es wird nur der Detektionslaserstrahl relativ dazu verfahren. Es ergibt sich ein Verlauf der Messwerte Amplitude und Phase über den Verschiebeweg des Detektionslaserstrahls. Die Messwerte werden in einem 2D Diagramm dargestellt mit der y-Achse für die Amplitude auf der linken Seite und den Amplitudenmesswerten in blau sowie der y-Achse für die Phase auf der rechten Seite und den Phasenmesswerten in Rot.

3.4.1 Ablauf einer Messung

Für eine Zero-Crossing-Messung muss im Menü „Modus“ „Zero Crossing“ ausgewählt sein. Nun können auf den Registerkarten die nötigen Einstellungen durchgeführt werden. Am besten geht man die Registerkarten von links nach rechts durch und macht die Einstellungen entsprechend der gewünschten Messung. Mit der Tabulatortaste kann man die Felder, auf denen Einstellungen gemacht werden können, einfach der Reihe nach anspringen. Die Registerkarten „allgemein“, „Kommentar“, „Grundeinstellungen“ und „Geräteparameter“ sind identisch mit den gleichnamigen Registerkarten der Flächenmessung, Beschreibung siehe dort.

3.4.1.1 Registerkarte „Zero Crossing Parameter“

- Gesamtweg gibt die Länge des Messweges an. Alternativ kann die Länge durch Wahl eines Endpunkts in der Registerkarte „Position anfahren“ gewählt werden
- Schrittweite wählt die räumliche Auflösung des Messweges
- Wartezeit an Messpunkt gibt an, wieviel Zeit nach Anfahren einer neuen Messposition und vor Beginn der Messung gewartet werden soll. In dieser Zeit kann sich die Thermische Linse und deren elektronisches Messsignal stabilisieren. Eine geeignete Wahl dieses Wertes ist von verschiedenen Parametern abhängig.
- Zeit pro Zero Crossing zeigt die voraussichtliche Dauer eines Zero Crossings mit den eingestellten Werten an. Der Wert ist gültig, wenn im zuletzt geänderten Feld „Return“ gedrückt wurde oder wenn der Fokus vom zuletzt geänderten Feld entfernt wird, dh. wenn in ein anderes Feld geklickt wird oder die Tabulatortaste gedrückt wurde. Hier ist keine Eingabe möglich.

- Im Bereich „mehrere Chopperfrequenzen“ kann eine (ein- oder mehrmalige) Wiederholung des Zero Crossing mit einer geänderten Chopperfrequenz gewählt werden. Jedes neue Zero Crossing wird in eine eigene Datei abgespeichert.
- Anzahl wählt die Anzahl der Scans, dh. Eintrag = 1 bedeutet keine Wiederholung
- Delta Chopperfreq wählt die Änderung der Chopperfrequenz.
- Bei Laserleistung kann ein Wert zur Dokumentation eingegeben werden

3.4.1.2 Registerkarte „Position anfahren“

Die Funktion der Elemente auf der Registerkarte „Position anfahren“ ist für die Zero-Crossing-Messung prinzipiell dieselbe wie für die Flächenmessung (siehe dort). Jedoch ist der Bedienablauf ein anderer, so dass dieser hier für die Zero-Crossing-Messung beschrieben wird.

- Zunächst muss mit den Pfeilbuttons in Kreuzanordnung ein Probenpunkt gewählt werden, an dem das Zero-Crossing durchgeführt werden soll. Es wird also der Anregungslaserstrahl positioniert. Dieser wird dann im weiteren Verlauf der Messung nicht mehr bewegt.
- Nun kann mit den Pfeilbuttons in vertikaler Anordnung die thermische Linse „von Hand“ abgefahren werden. Dabei kann die Länge des Verfahrweges der späteren automatischen Messung bestimmt werden.
- Mit den Buttons „=> Startposition“ und „=> Endposition“ können die entsprechenden Grenzen des Messweges festgelegt werden. Es genügt auch, nur die Startposition festzulegen, die Länge des Messweges wird dann durch den Eintrag in der Registerkarte „Zero Crossing Parameter“ gegeben.

3.4.1.3 Registerkarte „Start / Stopp“

Hier erfolgt der Start und Stopp einer Messreihe und die Anzeige des Fortschritts

Nach kompletter Einstellung der Parameter kann mit Start die Messreihe gestartet werden. Es erfolgt eine Abfrage, ob Einstellungen, die nicht von der Software vorgenommen werden können, richtig gesetzt wurden. Bei laufender Messung zeigt der obere Fortschrittsbalken den Fortschritt des aktuellen Zero Crossing an, der untere den der gesamten Messung. Während der Messung wird unter den Diagrammen die aktuelle Messposition sowie die aktuelle Aktivität des Systems angezeigt. Die Registerkarten sind für Eingaben gesperrt, außer „Kommentar“. Die Messreihe kann jederzeit mit Stopp abgebrochen werden. Nach regulärem Ende oder Abbruch einer Messung ist der Button „neue Messung“ freigegeben.

3.4.1.4 cos(phi)-Darstellung

Rechts unter dem Diagramm der Zero-Crossing Messwerte befindet sich ein Button „cos(phi) ein“. Bei Klick auf diesen Button teilt sich das Diagramm horizontal in zwei Diagramme. Das obere enthält die ursprüngliche Darstellung, das untere enthält die Darstellung des Cosinus des Phasenwinkels + einem zusätzlichen delta phi. Delta phi kann mit der Scrollbar neben dem Button verändert werden und wird ganz rechts angezeigt. Zweck dieses Diagramms es, für alle Zero-Crossing-Messungen eine einheitliche Auswertung zu ermöglichen. Beim Durchgang durch die Mitte der thermischen Linse findet ein Phasensprung von 180° statt. Das entspricht in der Cosinusdarstellung und bei richtig gewähltem delta phi einem Sprung von +1 nach -1 (oder umgekehrt). Mit dieser Einstellung von delta phi können dann die Ränder der thermischen Linse vermessen werden. Delta phi kann während einer laufenden Messung und bei wiedergeöffneten Messungen geändert werden. Die Cosinusdarstellung kann jederzeit ein- und ausgeschaltet werden.

3.5 Die Einpunktmessung

Die Einpunktmessung mißt das Thermische-Linse-Signal an einem Probenpunkt bei verschiedenen Chopperfrequenzen. Anregungs- und Detektionsstrahl bleiben an derselben Position, es wird nur von Messung zu Messung die Chopperfrequenz geändert. Die sich ergebenden Frequenzgänge für Amplitude und Phase werden als Standard in einem 2D-Diagramm dargestellt mit der y-Achse für die Amplitude auf der linken Seite und den Amplitudenmesswerten in blau sowie der y-Achse für die Phase auf der rechten Seite und den Phasenmesswerten in rot.

Die Einpunktmessung kann in regelmäßigen zeitlichen Abständen automatisiert wiederholt werden, so dass eine Messreihe aus mehreren Frequenzgängen an einem Probenpunkt entsteht. Diese Messreihe kann als 3D-Diagramme dargestellt werden, wobei die einzelnen Messreihen entlang der y-Achse aufgereiht werden. Die 3D-Diagramme können, wie bei der Flächenmessung schon beschrieben, mit der Maus gedreht und von verschiedenen Richtungen angesehen werden.

3.5.1 Ablauf einer Messung

Für eine Einpunktmessung muss im Menü „Modus“ „Ein-Punkt-Messung“ ausgewählt sein. Nun können auf den Registerkarten die nötigen Einstellungen durchgeführt werden. Am besten geht man die Registerkarten von links nach rechts durch und macht die Einstellungen entsprechend der gewünschten Messung. Mit der Tabulatortaste kann man die Felder, auf denen Einstellungen gemacht werden können, einfach der Reihe nach anspringen. Die Registerkarten „allgemein“, „Kommentar“, „Grundeinstellungen“ und „Geräteparameter“ sind identisch mit den gleichnamigen Registerkarten der Flächenmessung, Beschreibung siehe dort.

3.5.1.1 Registerkarte „Messungsparameter“

- Start Chopperfrequenz stellt den Startwert des Frequenzgangs ein.
- Ende Chopperfrequenz stellt den Endwert des Frequenzgangs ein.
- Delta Chopperfrequenz stellt die Änderung der Frequenz zwischen zwei Messungen ein.
- Wartezeit an Messpunkt gibt an, wieviel Zeit nach Einstellen und Stabilisierung einer neuen Chopperfrequenz und vor Beginn der Messung gewartet werden soll. In dieser Zeit kann sich die Thermische Linse und deren elektronisches Messsignal stabilisieren. Eine geeignete Wahl dieses Wertes ist von verschiedenen Parametern abhängig. Diese Zeit beinhaltet nicht die Wartezeit, bis die Chopperfrequenz stabil ist. Das System wartet selbständig, bis die Chopperfrequenz stabil ist, die dazu benötigte Zeit ist von der Chopperfrequenz abhängig und auch bei gleicher Chopperfrequenz unter Umständen sehr unterschiedlich.
- Zeit pro Frequenzgang zeigt die voraussichtliche Dauer eines Frequenzgangs mit den eingestellten Werten an. Aufgrund der sehr variablen Zeit zur Stabilisierung des Choppers ist dies nur ein grober Richtwert. Der Wert ist gültig, wenn im zuletzt geänderten Feld „Return“ gedrückt wurde oder wenn der Fokus vom zuletzt geänderten Feld entfernt wird, dh. wenn in ein anderes Feld geklickt wird oder die Tabulatortaste gedrückt wurde. Hier ist keine Eingabe möglich.
- Im Bereich „mehrere Frequenzgänge“ kann eine (ein- oder mehrmalige) Wiederholung des Frequenzgangs gewählt werden. Alle Frequenzgänge werden in dieselbe Datei abgespeichert.
- Anzahl wählt die Anzahl der Frequenzgänge, dh. Eintrag = 1 bedeutet keine Wiederholung
- Periode gibt die Periode der Wiederholungen an. Wenn ein Frequenzgang länger als die Periode dauert, wird sofort der nächste Frequenzgang gestartet.
- Ruheposition bestimmt einen Punkt, an dem der Anregungsstrahl platziert wird, wenn nach abgeschlossenem Frequenzgang auf den Ablauf der Periode zum Start des nächsten Frequenzgangs gewartet wird. Der Wert ist als Entfernung in negativer x- und y-Richtung vom Startpunkt zu verstehen.
- Bei Laserleistung kann ein Wert zur Dokumentation eingegeben werden.

3.5.1.2 Registerkarte „Position anfahren“

Die Funktion der Elemente auf der Registerkarte „Position anfahren“ ist für die Einpunktmessung dieselbe wie für die Flächenmessung (siehe dort). Da die Einpunktmessung aber nur an einem Probenpunkt stattfindet, gibt es keine Buttons „=> Startposition“ und „=> Endposition“. Es muss lediglich am gewünschten Probenpunkt ein möglichst hohes Thermische-Linse-Signal eingestellt werden.

3.5.1.3 Registerkarte „Start / Stopp“

Hier erfolgt der Start und Stopp einer Messreihe und die Anzeige des Fortschritts

Nach kompletter Einstellung der Parameter kann mit Start die Messreihe gestartet werden. Es erfolgt eine Abfrage, ob Einstellungen, die nicht von der Software vorgenommen werden können, richtig gesetzt wurden. Bei laufender Messung zeigt der obere Fortschrittsbalken den Fortschritt des aktuellen Frequenzgangs an, der untere den der gesamten Messung. Während der Messung wird unter den Diagrammen die aktuelle Frequenz sowie die aktuelle Aktivität des Systems angezeigt. Die Registerkarten sind für Eingaben gesperrt, außer „Kommentar“ und „Darstellung“. Die Messreihe kann jederzeit mit Stopp abgebrochen werden. Nach regulärem Ende oder Abbruch einer Messung ist der Button „neue Messung“ freigegeben.

3.5.1.4 Registerkarte „Darstellung“

Die Standarddarstellung eines Frequenzgangs ist in einem 2D-Diagramm (Chart). Wenn mehrere Frequenzgänge gemessen werden, so können diese auch räumlich hintereinander angeordnet in 3D-Darstellung angezeigt werden, so dass die zeitliche Veränderung der Probe sichtbar wird. Mit den Buttons „Chart“ und „3D“ kann zwischen den beiden Darstellungen umgeschaltet werden.

Bei der Chart-Darstellung kann der Frequenzgang ausgewählt werden, allerdings nur, wenn keine Messung läuft. In diesem Fall wird immer der aktuelle Frequenzgang angezeigt. Bei der 3D-Darstellung können ähnlich wie bei der Flächenmessung das Aussehen und die Achsen der 3D Diagramme verändert werden (siehe Darstellung bei der Flächenmessung). Eine farbige Darstellung der 3DDiagramme ist nicht vorgesehen.

3.6 Ansehen gespeicherter Messdaten

Wenn keine Messung läuft, können gespeicherte Messungen geladen werden und deren Einstellungen und Messwerte angesehen werden. Dazu muss im Menü „Datei“ „Messung öffnen...“ gewählt werden und eine Messdatendatei ausgewählt werden. Die auszuwählende Datei muss eine Messung enthalten, die dem gerade eingestellten Messmodus entspricht. Es können also zB nur Messdaten einer Flächenmessung geladen werden, wenn der Modus Flächenmessung eingestellt ist. Wurde in einer Messung zB der Kommentar verändert, kann diese wieder gespeichert werden mit „Datei“ „Messung speichern“. Die bestehende Datei wird überschrieben. Möchte man nach Ansicht gespeicherter Daten wieder eine Messung durchführen, so muss man „Datei“ „neue Messung“ wählen. Die Einstellungen der angesehenen Messung bleiben weitgehend erhalten.

3.7 Konfigurationen speichern und laden

Hat man für eine Messung die nötigen Einstellungen durchgeführt, können diese als Konfigurationsdatei abgespeichert werden und später wieder geladen werden. Dies wird im Menü „Datei“ mit den Menüpunkten „Konfiguration laden“, „Konfiguration speichern“ und „Konfiguration speichern als“ gemacht. Dabei muss beachtet werden, dass das Laden einer Konfiguration unter Umständen Einstellungen aller Modi verändert.

4 Dateiformat der Messdatendateien

Die Messdaten werden je nach Modus in einem eigenen Dateiformat gespeichert. Alle Dateiformate sind ASCII Dateien und können als zeichengetrennte Dateien zB in Excel eingelesen werden. Das Trennzeichen ist ';' (Strichpunkt). Die Dateien sind zweiteilig aufgebaut. Im oberen Teil befinden sich die für die Messung relevanten Einstellungen. Im unteren Teil befinden sich die Messdaten. Das Dezimalzeichen der Messdaten wird vor der Messung festgelegt und ist im oberen Teil der Datei angegeben.

4.1 Messdatenformat Flächenmessung

Bei der Flächenmessung sind die Daten folgendermaßen angeordnet:

Jeder Strichpunkt trennt eine Excel-Zelle.

1. Zeile: Messwerte:

2. Zeile: ; ; ;x-Pos1;x-Pos2;.....x-Pos-m; ; ;x-Pos1;x-Pos2;.....x-Pos-m;

3. Zeile: *Messdatum der Zeile; Messzeit der Zeile;y-Pos1;Amplitudenwert (x-Pos1,y-Pos1); Amplitudenwert (x-*

Pos2,y-Pos1);.... Amplitudenwert (x-Pos-m,y-Pos1); ;y-Pos1;Phasenwert (x-Pos1,y-Pos1); Phasenwert (x-Pos2,y-Pos1);.... Phasenwert (x-Pos-m,y-Pos1);

3. Zeile: *Messdatum der Zeile; Messzeit der Zeile;y-Pos2;Amplitudenwert (x-Pos1,y-Pos2); Amplitudenwert (x-*

Pos2,y-Pos2);.... Amplitudenwert (x-Pos-m,y-Pos2); ;y-Pos1;Phasenwert (x-Pos1,y-Pos2); Phasenwert (x-Pos2,y-Pos2);.... Phasenwert (x-Pos-m,y-Pos2);

.....

n+2. Zeile: *Messdatum der Zeile; Messzeit der Zeile;y-Pos-n;Amplitudenwert (x-Pos1,y-Pos-n); Amplitudenwert*

(x-Pos2,y-Pos-n);.... Amplitudenwert (x-Pos-m,y-Pos-n); ;y-Pos-n;Phasenwert (x-Pos1,y-Pos-n); Phasenwert (x-Pos2,y-Pos-n);.... Phasenwert (x-Pos-m,y-Pos-n);

n+3. Zeile: Ende Messwerte

4.2 Messdatenformat Zero-Crossing-Messung

Bei der Zero-Crossing-Messung sind die Daten folgendermaßen angeordnet:

Jeder Strichpunkt trennt eine Excel-Zelle.

1. Zeile: Zero Crossing Messwerte :

2. Zeile: Position;Amplitude;Phase:

3. Zeile: *Pos1; Amplitudenwert (Pos1); Phasenwert (Pos1);*

.....

n+2. Zeile: *Pos-n; Amplitudenwert (Pos-n); Phasenwert (Pos-n);*

n+3. Zeile: Ende Zero Crossing Messwerte

4.3 Messdatenformat Einpunktmessung

Bei der Einpunktmessung sind die Daten folgendermaßen angeordnet:

Jeder Strichpunkt trennt eine Excel-Zelle.

1. Zeile: Ein-Punkt Messwerte :

2. Zeile: ; ; ;Freq1;Freq2;.....Freq-m; ; ;Freq1;Freq2;.....Freq-m;

3. Zeile: *Messdatum der Zeile; Messzeit der Zeile;1;Amplitudenwert (Freq1); Amplitudenwert (Freq2);....*

Amplitudenwert (Freq-m); ;1;Phasenwert (Freq1); Phasenwert (Freq2);.... Phasenwert (Freq-m);

3. Zeile: *Messdatum der Zeile; Messzeit der Zeile;2;Amplitudenwert (Freq1); Amplitudenwert (Freq2);....*

Amplitudenwert (Freq-m); ;2;Phasenwert (Freq1); Phasenwert (Freq2);.... Phasenwert (Freq-m);

.....

n+2. Zeile: *Messdatum der Zeile; Messzeit der Zeile;n;Amplitudenwert (Freq1); Amplitudenwert (Freq2);...*

Amplitudenwert (Freq-m); ;n;Phasenwert (Freq1); Phasenwert (Freq2);.... Phasenwert (Freq-m);

n+3. Zeile: Ende Ein-Punkt Messwerte

7.2. Lebenslauf und Publikationen

Person

Name	Bernhard Gotter
Geburtsdatum	27.09.1979 in Nordhausen
Anschrift	Alemannengasse 23, 4058 Basel, Schweiz
E-Mail	bernhard.gotter@bayer.com

Ausbildung

1998	Gymnasium „Wilhelm von Humboldt“ in Nordhausen mit Abschluss: Abitur
1999 – 2004	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle/Wittenberg
2002	1. Staatsexamen Pharmazie
2004	2. Staatsexamen Pharmazie
11/2004 – 04/2005	Pharmaziepraktikum an der MLU (Bereich Technologie/Biopharmazie)
05/2005 – 10/2005	Pharmaziepraktikum in einer öffentlichen Apotheke in Halle
2005	3. Staatsexamen Pharmazie
12/2005	Approbation als Apotheker

Beruf

01-06/2006	Angestellter Apotheker in einer öffentlichen Apotheke / Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie der MLU
06/2006 bis 12/2009	Doktorand an der MLU mit Forschungsaufenthalt am KIT (Karlsruhe Institute of Technology)

Arbeitsgruppen:

Prof. Neubert (Institut für Pharmazie Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Halle)

Prof. Nüesch und später Prof. Woell (Institut für funktionelle Grenzfläche am KIT)

Aktuell

Apotheker in QA (Bayer AG Grenzach)

Publikationen

Gotter, B., Faubel, W., Neubert, R. H. H. *Optical methods for measurements of skin penetration.* 2008 3(21) Skin Pharmacology and Physiology

Gotter, B., Faubel, W., Neubert, R. H. H. *Photo-thermal imaging in 3D surface analysis of membrane drug delivery.* 2010 EJPB

Gotter, B., Faubel, W., Neubert, R. H. H. *FTIR microscopy and confocal Raman microscopy for studying lateral drug diffusion from a semisolid formulation.* 2010 EJPB

W. Faubel, B. Gotter, St. Heißler, M. Schlegel, R.H.H. Neubert. *Development of a photothermal double beam laser scanning system in biopharmaceutical applications* 2010 Journal of Physics

B. Gotter, W. Faubel, St. Heißler, J. Hein, R.H.H. Neubert *Determination of drug content in semisolid formulations by non-invasive spectroscopic methods: FTIR - ATR, - PAS, - Raman and PDS.* 2010 Journal of Physics

Univations & Scidea Ideenwettbewerb 2008/2009 (1. Platz)

7.3. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ort, Datum

Unterschrift

7.4. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeiten zur Erstellung der Dissertation unterstützt haben.

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. R. Neubert für die Vergabe dieses interessanten Themas, als auch für sein fortwährendes Interesse am Fortgang der Arbeiten. Für die Möglichkeit, von Beginn an die Ergebnisse öffentlich präsentieren und dadurch Erfahrungen sammeln zu können, bin ich ihm ebenfalls dankbar.

Des Weiteren möchte ich auch dem ehemaligen Institutsleiter des ITC Prof. Dr. R. Nüesch danken, dass die Forschungsarbeiten im Rahmen der vorgelegten Doktorarbeit an seinem Institut, dem späteren IFG in Karlsruhe, durchgeführt werden konnten. Über die Nutzung des photothermischen Messplatzes hinaus standen mir alle Einrichtungen und Verfahren des IFG zur Verfügung. Ebenso danke ich Prof. Dr. C. Woell, dem Nachfolger von Herrn Nüesch, der die Fortführung der Arbeit am IFG ermöglichte.

Herrn Dr. Werner Faubel gilt mein besonderer Dank für die intensive Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit. Die von ihm eingeräumte weitgehende Freiheit bei der Konzipierung und Planung der Arbeiten im Zusammenhang mit seiner ständigen Bereitschaft zur kritischen Diskussion der Ergebnisse haben maßgeblich zum erfolgreichen Fortgang der Arbeiten beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Herrn St. Heissler für die wertvolle Unterstützung bei allen technischen Fragestellungen und die Weitergabe seines großen Wissens hinsichtlich schwingungsspektroskopischer Anwendungen.

Ebenfalls danke ich Herrn M. Mensch für die gute Zusammenarbeit und seinen sehr wertvollen Beitrag zur Erstellung des photothermischen Scanners.

Für die Diskussion mathematischer Fragestellungen zur Diffusion in Membranen möchte ich Herrn Dr. H. Podhaisky und Dr. H. Metz danken.

Bei Frau H. Rudolf möchte ich mich für ihre Hilfe bei spektroskopischen Messungen und ihre stete Hilfsbereitschaft in allen Fragen bedanken.

Allen wissenschaftlichen Mitarbeitern danke ich für die angenehme, freundliche Atmosphäre im Labor und die zahllosen interessanten Diskussionen.