

Modellierung des Wassergehaltes der Haut in der kosmetischen Forschung basierend auf Spektroskopie-Messungen

Volker Schoder
proDERM, Institut für
angewandte dermatologische
Forschung GmbH
Kiebitzweg 2
22869 Schenefeld
VSchoder@proDERM.de

Maria Köper
proDERM, Institut für
angewandte dermatologische
Forschung GmbH
Kiebitzweg 2
22869 Schenefeld
MKoeper@proDERM.de

Ulrike Ely
proDERM, Institut für
angewandte dermatologische
Forschung GmbH
Kiebitzweg 2
22869 Schenefeld
UEly@proDERM.de

Zusammenfassung

In der kosmetischen Forschung spielt die Messung des Wassergehaltes der Haut eine zentrale Rolle, so z.B. für den Wirksamkeitsnachweis einer Feuchtigkeitscreme. Eine neuer Ansatz hierfür besteht in der Anwendung der RAMAN-Spektroskopie, welche im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden (Corneometer) den Wassergehalt nicht nur als Gesamtwert in den obersten 10 μm , sondern auch in beliebigen Tiefen der oberen Hautschichten ermitteln kann.

In diesem Beitrag wird ein biologisch begründetes Modell für derartige Daten präsentiert und die Umsetzung und Parameterschätzung mittels PROC NLIN in SAS demonstriert. Anhand einer beispielhaften Studie wird zudem die Auswertung anhand der errechneten Modellparameter unter Nutzung von PROC MIXED dargestellt.

Schlüsselwörter: Kosmetische Forschung, Raman, Spektroskopie, Punktspreizfunktion, Fick'sches Gesetz

1 Einleitung

Reinigung und Pflege der Haut gehören zu den elementaren Bedürfnissen des Menschen. Um diesem gerecht zu werden, ist die kosmetische Forschung bestrebt Wirksamkeit und Verträglichkeit von Reinigungs- und Pflegeprodukten stetig weiterzuentwickeln.

Mit vielen kosmetischen Produkten (Feuchtigkeitscremes, Gesichtsmasken, spezielle Nahrungsergänzungsmittel) wird gezielt versucht, Einfluss auf den Wassergehalt der

obersten Hautschicht (Stratum Corneum) zu nehmen bzw. diese vor Austrocknung zu schützen.

Mit der RAMAN-Spektroskopie steht eine neuartige Messmethodik zur Verfügung, um den Wassergehalt der Haut nicht nur an bzw. direkt unter der Oberfläche (wie bei herkömmlichen Verfahren, z.B. der Corneometrie) sondern in beliebigen Tiefen und in Abständen von wenigen μm zu messen. Derartige Daten stellen besondere Herausforderungen an die Auswertung, insbesondere ist es nötig den Verlauf des Wassergehaltes innerhalb der obersten Hautschicht sinnvoll zu modellieren.

Ein entsprechendes Modell basierend auf zwei linearen Komponenten und einer sog. Punktpreisfunktion wird im Folgenden beschrieben. Es wird insbesondere gezeigt, wie die Modellparameter durch die Prozedur NLIN geschätzt werden können.

Abschließend wird die Anwendung der Methodik anhand einer Beispielstudie aus unserem Institut diskutiert.

2 Hintergrund

2.1 Die menschliche Haut

Die Haut (lat. cutis) ist das flächenmäßig größte, schwerste und funktionell vielseitigste Organ des menschlichen Körpers. Sie bedeckt ungefähr eine Fläche von 1,5 bis 2 m^2 und kann ein Gewicht von bis zu 10 kg annehmen. Die Epidermis ist die äußerste Hautschicht des Menschen und wird aus diesem Grund auch als Oberhaut bezeichnet. Sie ist die eigentliche Schutzhülle des Menschen gegenüber seiner Umwelt und auch für die Regulierung des Wasserhaushaltes verantwortlich. Das Stratum Corneum (Hornschicht) bildet die äußere Schicht der Epidermis und somit auch die äußerste Schicht der Haut mit einer Dicke von ca. 15 – 20 μm .

Sie besteht aus abgestorbenen Hornzellen, die gemeinsam mit dazwischen befindlichen Lipiden eine wasserabweisende Hülle bilden, und dient im wesentlichen als Schutzschicht vor Verletzungen und Austrocknung durch transepidermalen Wasserverlust (Barrierefunktion). Entsprechend versuchen kosmetische Pflegeprodukte (z.B. Feuchtigkeitscremes) das Stratum Corneum mit Feuchtigkeit zu versorgen und gleichzeitig die Speicherfähigkeit für Wasser zu erhöhen [1].

2.2 RAMAN Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie ist eine physikalische Messmethode die auf den indischen Nobelpreisträger C.V. Raman (1888-1970) zurückgeht und insbesondere zur Bestimmung von Materialeigenschaften in der Molekül- und Festkörperphysik Anwendung findet. Sie beruht darauf, dass Moleküle monochromatisches Licht streuen und durch eine vorübergehende Wechselwirkung zusätzliche Spektrallinien, sog. Raman-Linien erzeugen.

In der kosmetischen Forschung ist die Anwendung der Raman-Spektroskopie verhältnismäßig neu. Es können prinzipiell alle Substanzen untersucht werden, die ein Raman-signal erzeugen, dazu gehören neben Wasser auch z.B. Proteine und Schweißkompo-

nenten. Als Lichtquelle dient ein Laser, dessen Streulicht auf einen sog. Monochromator umgeleitet wird, wo die entsprechende Intensität aufgezeichnet wird.

Die Messungen finden in der Regel auf mehreren Feldern am Unterarm statt und werden für variable Hauttiefen in Abständen von 2 – 4 μm durchgeführt.

Im Falle der Bestimmung des Wassergehaltes erfolgt eine Normierung auf die Signalintensität des gemessenen Keratins [2].

3 Modellierung des Wassergehaltes der Haut

3.1 Biologische Motivation

Die mit dem Raman-Spektrometer erhobenen Messwerte müssen zunächst einem Datenbereinigungsprozess unterzogen werden, im Laufe dessen u.a. Normierungen stattfinden und auch implausible Werte ausgeschlossen werden, die z.B. durch versehentliche Messung eines Blutgefäßes entstehen können. Trägt man die so erhaltenen Daten für einen Probanden gegen die Hauttiefe ab, so erhält man die in Abb. 1 dargestellte Form.

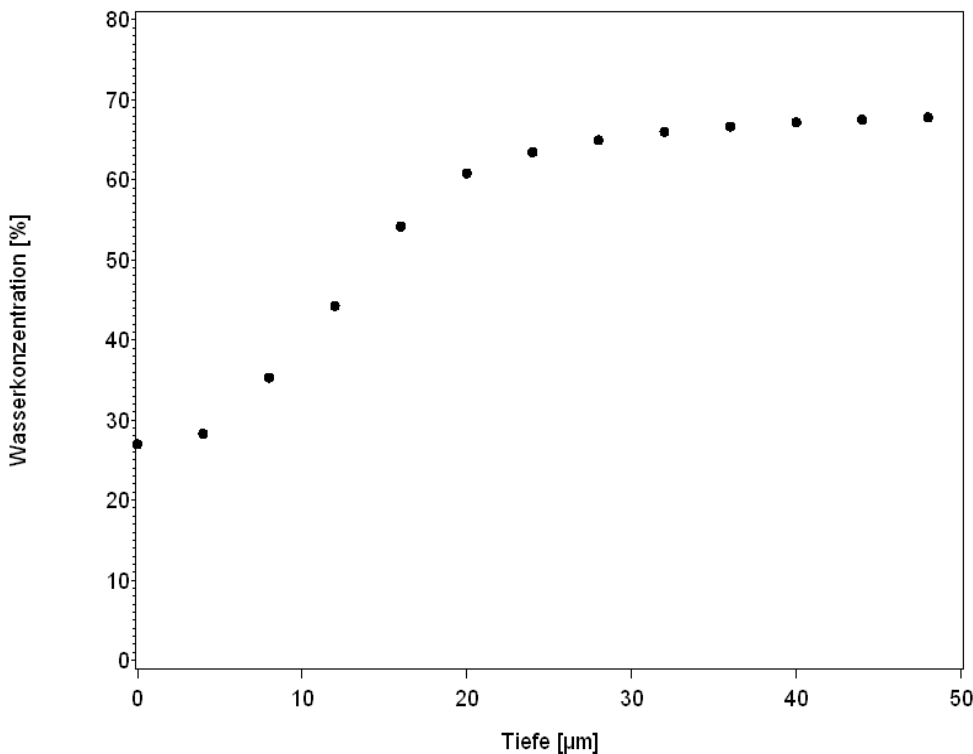


Abbildung 1: Bereinigte Messdaten für einen Probanden

Bei erster Betrachtung könnte der Eindruck einer sigmoidalen Funktion entstehen, wie sie z.B. in der Pharmakokinetik häufig verwendet wird. Eine bessere und plausible Anpassung erhält man jedoch, wenn man die biologischen Hintergründe berücksichtigt.

Betrachtet man den Wassergehalt der Haut aus physiologischer Perspektive, so findet im Prinzip ein stetiger Diffusionsprozess statt. Auf der Hautoberfläche verdunstet Wasser, dies führt zu einem Konzentrationsgefälle, welches wiederum eine kontinuierliche Transportbewegung aus den unteren in die oberen Hautschichten auslöst. Gemäß dem ersten Fick'schen Gesetz [3] ist die Teilchenstromdichte in einem solchen Diffusionsprozess proportional zum Konzentrationsgradienten, weshalb man im vorliegenden Fall den Wassergehalt als lineare Funktion der Tiefe betrachten kann, dies jedoch aufgrund der verschiedenen Struktur und klaren Abgrenzung mit verschiedenen Steigungen in Stratum Corneum und der darunterliegenden Hautschicht.

Betrachtet man Abb. 1, und nimmt die Untergrenze des Stratum Corneums etwa bei 18 μm an, so erscheint in der Tat die Anpassung zweier Geraden unterschiedlicher Steigung möglich, siehe Abb. 2

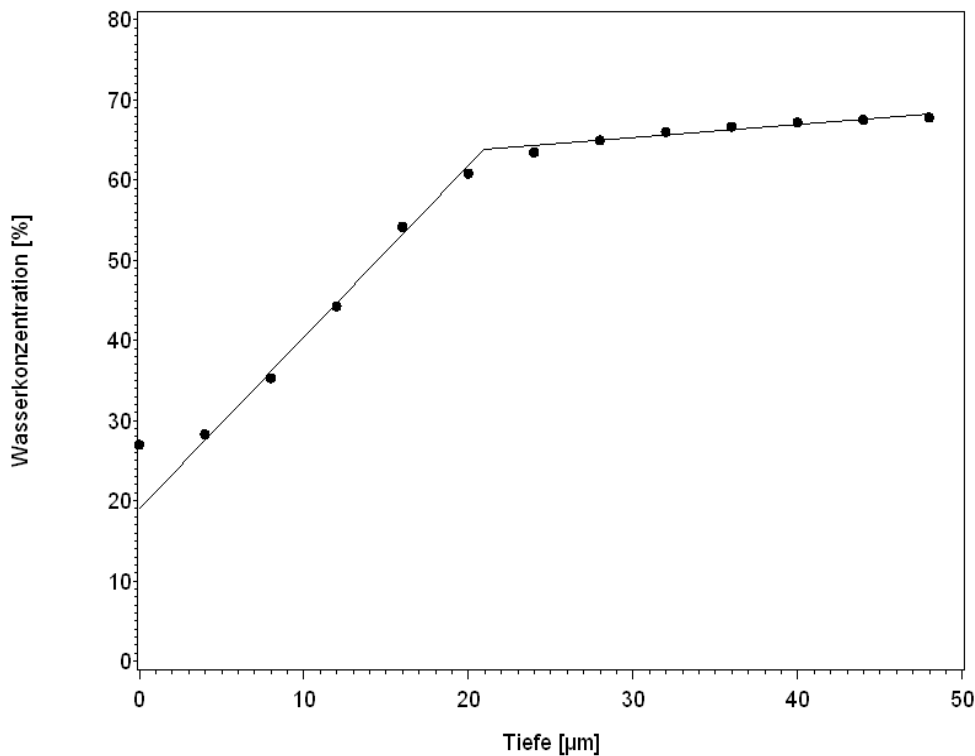


Abbildung 2: Anpassung von 2 Geraden

Allerdings sind zwei Einschränkungen klar erkennbar: Für die beiden Messungen direkt an der Hautoberfläche und in 4 μm Tiefe gilt der lineare Zusammenhang offenbar nicht, dies liegt zum einen an Rückständen auf der Haut, welche diese Messungen verfälschen und zum anderen an der teils schon aufgelösten Struktur der Hornzellen direkt unter der Oberfläche. Deshalb ist es sinnvoll, eine Modellierung erst ab einer Tiefe von etwa 8 μm zu beginnen. Die zweite Einschränkung betrifft den Übergang zwischen Stratum Corneum und der darunterliegenden Hautschicht, der offensichtlich "runder" verläuft als bei zwei Geraden

zu erwarten. Dies lässt sich jedoch mittels der sog. Punktspreizfunktion (Point Spread Function) erklären.

3.2 Die Punktspreizfunktion

Die Punktspreizfunktion ist u.a. aus der Optik bekannt und beschreibt, wie ein idealisiertes punktförmiges Objekt durch ein System abgebildet wird. Die Punktspreizfunktion ist gerätespezifisch und bestimmt für Mikroskope beispielsweise die maximal erreichbare Auflösung. Im Falle der Raman-Spektroskopie ist die Intensität des Laserstrahls im Zentrum am höchsten und flacht zum Rand hin ab. Die Punktspreizfunktion beschreibt damit den Einfluss der umgebenden Region auf die Messung des Wassergehaltes in einem bestimmten Punkt.

Mit der Punktspreizfunktion ist es möglich den "runden" Übergang der Messwerte zwischen Stratum Corneum und Stratum Granulosum zu erklären, da jeder Funktionswert im Grenzbereich eben auch von benachbarten Punkten in der anderen Hautschicht beeinflusst wird.

Die Punktspreizfunktion des Raman-Gerätes wurde experimentell ermittelt und wird durch eine Normalverteilung mit Standardabweichung $(2.12 \mu\text{m})^2$ repräsentiert. Damit kann gemäß dem Ansatz der diskreten Faltung der Wassergehalt an jedem Punkt durch ein gewichtetes Mittel aus allen benachbarten Punkten modelliert werden, wobei sich die Gewichte entsprechend der Dichtefunktion obiger Normalverteilung ermitteln lassen.

4 Umsetzung der Modellierung mit PROC NLIN

Die zuvor beschriebene Modellierung des Wassergehaltes besteht somit aus zwei Geraden unterschiedlicher Steigung, wobei der Schnittpunkt der Geraden den Schätzwert für die Untergrenze des Stratum Corneums widerspiegelt. Die Modellierung erfolgt über ein gewichtetes Mittel, wobei die Gewichte aus einer Normalverteilung stammen. Die Umsetzung erfolgt in SAS mittels der Prozedur PROC NLIN [4], zuvor müssen jedoch die Gewichte definiert werden.

Das vorliegende Programm wurde zur Auswertung von Studien erstellt, in denen der Wassergehalt in Hauttiefen im Abstand von $4 \mu\text{m}$ gemessen wurde. In diesem Fall ist der Einfluss eines Punktes der mehr als $12 \mu\text{m}$ (~ 6 Standardabweichungen der Punktspreizfunktion) vom Messpunkt entfernt ist verschwindend gering, deshalb werden im Folgenden maximal die drei Nachbarpunkte im Abstand von 4 , 8 und $12 \mu\text{m}$ in beide Richtungen betrachtet. Die Gewichte werden in SAS als Makroparameter definiert:

```
%LET c1=0.7458;  
%LET c2=0.1265;  
%LET c3=0.0006167;  
%LET c4=8.648E-08;
```

Hierbei wird c_1 dem Messpunkt selbst, c_2 den beiden Punkten im Abstand von $\pm 4\mu\text{m}$, c_3 den beiden Punkten im Abstand von $\pm 8\mu\text{m}$ und c_4 analog den beiden Punkten im Abstand von $\pm 12\mu\text{m}$ zugeordnet.

Es erfolgte zusätzlich eine Normierung, sodass die Bedingung $c_1+2c_2+2c_3+2c_4=1$ erfüllt ist.

Für die Modellierung selbst wurde folgender SAS-Code verwendet:

```
PROC NLIN DATA=raman_model
  MAXITER=100;
  CONVERGE=0.00000000001;
  PARMS b0=15 TO 25 BY 5 /* 1 */
        a0=1 TO 3 BY .5
        b1=55 TO 65 BY 5
        a1=0 TO 0.2 BY .1;
  BY subject area time ; /* 2 */

IF (a0>a1) and (b1>b0) and (a0 > 0) Then /* 3 */
  DO;
  SC=(b0-b1)/(a1-a0); /* 4 */

  IF depth le SC and depth > SC-4 Then /* 5 */
  DO;
  MODEL mean_new= (&c1+&c2+&c3+&c4) * (a0*depth+b0)
                + (4*&c2+8*&c3+12*&c4) * (a1-a0)
                + (&c2+&c3+&c4) * (a1*depth+b1);
  END;

  ELSE IF depth le SC-4 and depth > SC-8 Then /* 6 */
  DO;
  MODEL mean_new= (&c1+2*&c2+&c3+&c4) * (a0*depth+b0)
                + (8*&c3+12*&c4) * (a1-a0)
                + (&c3+&c4) * (a1*depth+b1);
  END;

  ELSE IF depth le SC-8 and depth > SC-12 Then /* 7 */
  DO;
  MODEL mean_new= (&c1+2*&c2+2*&c3+&c4) * (a0*depth+b0)
                + (12*&c4) * (a1-a0) + (&c4) * (a1*depth+b1);
  END;

  ELSE IF depth le SC-12 Then /* 8 */
  DO;
  MODEL mean_new= (&c1+2*&c2+2*&c3+2*&c4) * (a0*depth+b0);
  END;

  ELSE IF depth ge SC and depth < SC+4 Then /* 9 */
  DO;
  MODEL mean_new= (&c2+&c3+&c4) * (a0*depth+b0)
                + (4*&c2+8*&c3+12*&c4) * (a1-a0)
                + (&c1+&c2+&c3+&c4) * (a1*depth+b1);
```

```

END;
ELSE IF depth ge SC+4 and depth < SC+8 Then
DO;
MODEL mean_new=(&c3+&c4) * (a0*depth+b0)
+ (8*&c3+12*&c4) * (a1-a0)
+ (&c1+2*&c2+&c3+&c4) * (a1*depth+b1);
END;

ELSE IF depth ge SC+8 and depth < SC+12 Then
DO;
MODEL mean_new=(&c4) * (a0*depth+b0)
+ (12*&c4) * (a1-a0)
+ (&c1+2*&c2+2*&c3+&c4) * (a1*depth+b1);
END;

ELSE IF depth ge SC+12 Then
DO;
MODEL mean_new=(&c1+2*&c2+2*&c3+2*&c4) * (a1*depth+b1);
END;
END;

OUTPUT OUT=results PARS=b0 a0 b1 a1 predicted=pred
residual=resid;
/* 13 */

RUN;

```

Zu Beginn der Prozedur müssen die zu schätzenden Parameter im Statement PARS definiert werden (1). Dies sind Achsenabschnitt (b_0) und Steigung (a_0) der Geraden im Stratum Corneum und Achsenabschnitt (b_1) und Steigung (a_1) der Geraden im Stratum Granulosum.

Natürlich ist es sinnvoll, für jede Messreihe eine separate Schätzung durchzuführen. Üblicherweise werden derartige Studien an mehreren Probanden durchgeführt, wobei jedem Proband auf mehreren Testfeldern je ein Testprodukt appliziert wird. Wiederholt man die Messung mehrmals zu verschiedenen Zeitpunkten so ist es anschließend möglich, sowohl Produkt- als auch Zeiteffekte auszuwerten. Mit einem einfachen by-statement (2) erhält man die getrennte Schätzung der Modellparameter.

Nach Abfrage einiger Nebenbedingungen (3) ist es nötig, die Untergrenze (und damit die Dicke) des Stratum Corneums (SC) zu bestimmen. Diese ergibt sich einfach aus der x-Koordinate des Schnittpunktes der beiden Geradengleichungen (4).

Für die Modellierung selbst ist eine Unterscheidung in acht Fälle nötig, Fall Nummer eins (5) bezieht sich auf den Punkt, der direkt oberhalb der Stratum Corneum Untergrenze liegt. Die entsprechende Modellgleichung im MODEL statement erhält man, indem man die separaten Geradengleichungen für den Punkt x selbst und die drei jeweils darüber – und darunterliegenden Punkte mit den entsprechenden Gewichten aufsummiert und den entstehenden Term algebraisch umformt.

Ein analoges Vorgehen ergibt die Modelle (6) und (7) für den zweiten bzw. dritten Punkt oberhalb der berechneten Stratum Corneum Dicke. Für alle darüberliegenden Messpunkte (8) reduziert sich das Modell wieder zu der reinen Geradengleichung in-

nerhalb des Stratum Corneums. Hier zeigt sich der Sinn der zuvor beschriebenen Normierung der Gewichte, denn dadurch wird erreicht, dass die geschätzten Modellparameter a_0 und b_0 auch tatsächlich den Achsenabschnitt bzw. die Steigung der Gerade repräsentieren. Analog erklären sich die Modelle (9) bis (12) für alle Messpunkte unterhalb der errechneten Stratum Corneum Grenze.

Wie in allen SAS-Prozeduren ist es auch in PROC NLIN möglich, die errechneten Parameter mittels OUTPUT statement (13) in eine Datei ausgeben zu lassen.

Da es sich bei der Modellfunktion um eine schrittweise lineare Funktion handelt ist es zusätzlich möglich, aus vorhergesagten und beobachteten Werten das Bestimmtheitsmaß R^2 in einer DATA STEP Routine zu errechnen. Es ergaben sich hierbei in allen bisher durchgeführten Studien durchweg zufriedenstellende Werte $> 99\%$.

5 Berechnung von Auswertungsparametern

Im Rahmen der Auswertung einer Studie ist es nötig, sich Gedanken über die Endpunkte zu machen, die letztlich analysiert werden.

Vom biologischen Standpunkt interessierende Parameter sind im vorliegenden Fall

- Geradensteigung innerhalb des Stratum Corneums (a_0)
- Geradensteigung in den tieferen Schichten (a_1)
- Stratum Corneum Dicke (SC)
- Fläche unter der Modellkurve (AUC_0) innerhalb des Stratum Corneums
- Fläche unter der Modellkurve (AUC_1) unterhalb des Stratum Corneums

Die ersten drei Parameter sind direkt als Modellparameter zu entnehmen.

Die beiden Flächen lassen sich in SAS z.B. mit einem DATA STEP anhand der exportierten vorhergesagten Werte (s. OUTPUT statement (13) "predicted") unter Zuhilfenahme der Trapezformel berechnen. Dies kann z.B. innerhalb eines separaten DATA STEPS geschehen, wobei zunächst noch der Funktionswert an der Stratum Corneum Grenze anhand der Modellgleichung ermittelt werden muss.

Im Falle der Fläche unterhalb des Stratum Corneums ist es sinnvoll, eine einheitliche Untergrenze zu definieren, die natürlich von der maximalen Tiefe der Messungen abhängig ist. Da die Obergrenze variabel ist, sollte dies aus Gründen der Vergleichbarkeit auch die Untergrenze sein, d.h. es bietet sich eine Berechnung von der errechneten Stratum Corneum Grenze SC bis z.B. SC+20 μm an.

In Abbildung 2 finden sich alle Modellparameter grafisch aufbereitet. Zusätzlich erkennt man deutlich die bessere Anpassung der Modellfunktion an die beobachteten Werte in der Umgebung der Stratum Corneum Grenze.

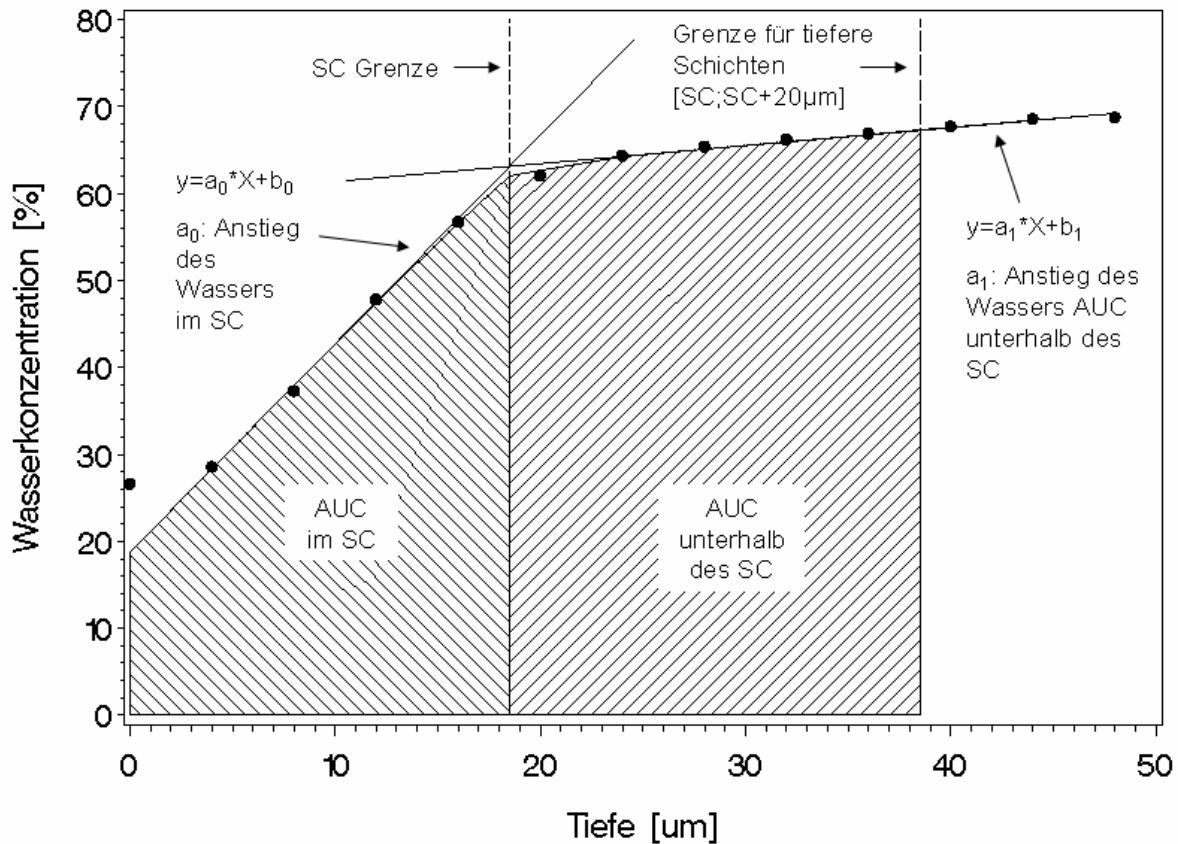


Abbildung 3: Modellfunktion und Auswertungsparameter

6 Beispielstudie

6.1 Beschreibung

Im Folgenden soll die endgültige Datenauswertung anhand einer exemplarischen Studie demonstriert werden. Hierbei wurden bei 15 Probanden Messungen auf je einem Feld pro Unterarm durchgeführt, eines der beiden Felder wurde dabei im Laufe der Studie mit einem Testprodukt (Feuchtigkeitscreme) behandelt, während die andere Seite unbehandelt blieb. Messungen (RAMAN, Corneometer, Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)) erfolgten dabei zu Beginn der Studie, und zwei und fünf Stunden nach der ersten Produktapplikation. Zusätzlich fand eine Messung nach dreiwöchiger Produktapplikation statt.

6.2 Auswertung in SAS

Die varianzanalytische Auswertung erfolgt für jeden einzelnen der vorab beschriebenen Parameter separat, Ziel ist selbstverständlich der Nachweis eines Produkteffektes im Vergleich zum unbehandelten Kontrollfeld. Die Modellierung erfolgt mit PROC MI-

XED hier exemplarisch für die Auswertung des Steigungsparameters im Stratum Corneum dargestellt:

```
PROC MIXED Data=raman_results;
  CLASS product timepoint panelist;
  MODEL a0 = product timepoint product*timepoint;
  REPEATED / type=UN R subject=panelist;
  LSMEANS product*timepoint /ADJUST=TUKEY;
  ODS OUTPUT tests3=anova_a0_results;
RUN;
```

In das Modell gehen zwei feste Faktoren (Zeitpunkt und Behandlung) und deren Interaktion ein. Wie in der Dermatologie üblich liegen auch bei dieser Studie korrelierte Wiederholungsmessungen am selben Individuum vor. Um dies zu berücksichtigen wird das REPEATED-Statement mit der SUBJECT= Definition benötigt. Die Modellierung der Kovarianzstruktur findet in diesem Beispiel mit dem flexibelsten Ansatz (TYPE= UN, d.h. "Unstructured") statt, insbesondere bei Konvergenzproblemen kommen natürlich auch andere von SAS angebotene Kovarianzstrukturen in Frage. Ebenso ist es natürlich möglich alternative Adjustierungsansätze für den Produktvergleich pro Zeitpunkt zu wählen und weitere Modellergebnisse neben der ANOVA-Tabelle mittels ODS OUTPUT zu exportieren.

6.3 Ergebnisse

Exemplarisch sei in Tabelle 1 das Ergebnis für den Parameter a_0 , also der Geradensteigung im Stratum Corneum dargestellt.

Tabelle 1: Studienergebnisse Steigungsparameter im Stratum Corneum

Zeitpunkt	Mittelwert Produkt	Mittelwert Kontrolle	p-Werte (Tukey)
Tag 1 Baseline	2.01	1.94	0.588
Tag 1, 2h	2.43	2.05	<0.001
Tag 1, 5h	2.34	2.08	<0.001
Tag 21	2.35	2.21	0.137

Man erkennt einen Anstieg von a_0 auf der behandelten Fläche, was einem steileren Verlauf des Diffusionsprozesses entspricht. Dies impliziert eine verbesserte Barrierefunktion des Stratum Corneums und (bei konstanter Stratum Corneum Dicke) eine größere gespeicherte Wassermenge im Stratum Corneum. Somit kann von einer feuchtigkeitsspendenden Wirkung des Produktes ausgegangen werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse an Tag 21 (Anstieg auf Kontrollfeld) ist zu beachten, dass hier auch äußere Einflüsse eine Rolle spielen können, so z.B. Witterungsänderungen.

Bei der vorliegenden Studie wurden zudem Korrelationen zwischen den einzelnen Auswertungsparametern des Raman-Modells und den etablierten Messmethoden (Cor-

neometer und TEWL) errechnet. Insbesondere für die beiden Parameter a_0 (Wassergradient im Stratum Corneum) und AUC_1 (Fläche unterhalb des Stratum Corneums) erhält man zufriedenstellende Korrelationen zur Corneometermessung ($r \sim 0.3 - 0.7$). Etwas überraschend ist, dass keine einheitliche Korrelation zwischen Raman-Parametern und der Messung des transepidermalen Wasserverlustes zu erkennen ist.

7 Fazit

Durch die Raman-Spektroskopie wird das Spektrum der Möglichkeiten zur Messung der Wirksamkeit von kosmetischen Produkten deutlich erweitert und verbessert. Eine wichtige Anwendung ist hierbei die Messung und Modellierung des Wassergehaltes der oberen Hautschichten. Durch Zusammenarbeit von Fachwissenschaftlern und Statistikern wurde hierfür bei proDERM ein biologisch motiviertes Modell entwickelt und die Parameterschätzung in SAS etabliert. Der weitere Verlauf der Datenauswertung basiert dann auf errechneten Modellgrößen und kann mit Standardmethoden erfolgen. Durch Einbindung in ein allgemeines Makro können somit entsprechende Studien effizient ausgewertet werden.

Die genaue Interpretation einzelner Ergebnisse gestaltet sich aufgrund des komplexen biologischen Diffusions- und Verdunstungsprozesses nicht immer einfach, insbesondere wenn man das Zusammenspiel der (korrelierten) Einzelparameter berücksichtigt.

Literatur

- [1] J. Fluhr, P. Elsner, E. Berardesca, H.I. Maibach (Eds.): Bioengineering of the skin: Water and Stratum Corneum 2nd edition (2005). CRC Press, Boca Raton
- [2] P.J. Caspers et al.: Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin. *J Raman Spectroscopy* 31 (2000),813-18.
- [3] Adolf Fick: Über Diffusion. *Poggendorff's Annalen der Physik* 94 (1855), 59–86.
- [4] SAS OnlineDoc 9.1.3 – The NLIN Procedure