

---

# **BACHELORARBEIT**

---

Frau  
**Josephine Romy Zahm**

**Spektroskopische Analyse  
altersbedingter  
Veränderungen in Farbe und  
Zusammensetzung sehr alter  
forensischer Blutproben**

Mittweida, 2022



# **BACHELORARBEIT**

---

## **Spektroskopische Analyse altersbedingter Veränderungen in Farbe und Zusammensetzung sehr alter forensischer Blutproben**

Autorin:  
**Frau Josephine Romy Zahm**

Studiengang:  
**Allgemeine und Digitale Forensik**

Seminargruppe:  
**FO18w1-B**

Erstprüfer:  
**Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde**

Zweitprüfer:  
**M. Sc. Tommy Bergmann**

Einreichung:  
**Mittweida, 22.11.2022**

Verteidigung/Bewertung:  
**Mittweida, 2022**

# **BACHELOR THESIS**

---

## **Spectroscopic and microscopic analysis of age-related changes in color and composition of very old forensic blood samples**

author:

**Ms. Josephine Romy Zahm**

course of studies:

**General and Digital Forensic Science**

seminar group:

**FO18w1-B**

first examiner:

**Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde**

second examiner:

**M.Sc. Tommy Bergmann**

submission:

**Mittweida, 22.11.2022**

defence/evaluation:

**Mittweida, 2022**

---

## **Bibliografische Angaben**

Zahm, Josephine Romy:

Spektroskopische Analyse altersbedingter Veränderungen in Farbe und Zusammensetzung sehr alter forensischer Blutproben, 67 Seiten, 20 Abbildungen, 6 Tabellen.

Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2022

## **Referat**

An einem Tatort lassen sich verschiedene Arten von Spuren finden. Die Blutspuren zählen dabei zu den wichtigsten. Sie lassen sich auf unterschiedliche Art und Weise analysieren. Eine Möglichkeit ist die Untersuchung des Blutalters, um beispielsweise Hinweise über den Zeitraum einer Tat zu erlangen. Schon seit dem 20. Jahrhundert suchen Wissenschaftler nach einer geeigneten Methode zum Ermitteln des Alters einer Blutspur. Bisher ist das aber noch keinem gelungen. In dieser Bachelorarbeit wird mittels UV/VIS-Spektroskopie die Alterung von Schweineblut über einen Zeitraum von sechs Wochen bei gleichbleibenden Umwelteinflüssen untersucht. Im Vordergrund steht hierbei die alterskorrelierende Veränderung der Blutzusammensetzung. Das Hauptaugenmerk liegt vor allem auf den Peaks der Hämoglobinderivate und des Globins. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde festgestellt, dass all diese charakteristischen Hochpunkte auch nach sechs Wochen noch weiter ansteigen und sich somit die Zusammensetzung des Blutes weiterhin verändert.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Motivation .....	1
1.2 Zielstellung.....	2
<b>2 Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
2.1 Funktionen des Blutes.....	3
2.2 Zusammensetzung des Blutes .....	4
2.2.1 Erythrozyten.....	5
2.2.2 Leukozyten .....	5
2.2.3 Thrombozyten.....	6
2.2.4 Hämoglobin.....	6
2.2.5 Blutplasma .....	7
2.3 Blut in der Forensik .....	8
2.3.1 Spurenbegriff .....	8
2.4 Blutaltersbestimmung.....	9
2.5 Blutabbau.....	12
2.5.1 <i>in vivo</i> .....	12
2.5.2 <i>ex vivo</i> .....	14
2.6 UV/VIS-Spektroskopie .....	15
2.6.2 Einstrahl-Spektrophotometer.....	16
2.6.3 Zweistrahl-Spektrophotometer .....	17
2.6.4 Blutspektrum.....	17
<b>3 Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1 Materialien .....	19
3.1.1 Blut .....	19
3.1.2 Trägermaterial.....	19
3.1.3 Lösemittel .....	19
3.1.4 Weitere Materialien .....	20
3.2 Geräte.....	20
3.2.1 Spektrophotometer Shimadzu UV-1800.....	20

---

3.3	Verwendete Programme .....	22
3.4	Umwelteinflüsse .....	22
3.5	Methoden .....	23
3.5.1	Vorbereitung .....	23
3.5.2	Spektroskopische Messungen .....	24
3.5.3	Statistische Auswertung der Daten .....	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>42</b>
5.1	Fazit .....	45
5.2	Fehlerquellen .....	45
<b>6</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>46</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>XIV</b>
	<b>Anlagen, A1</b> .....	<b>XIX</b>
	<b>Eigenständigkeitserklärung</b> .....	<b>XXII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AFM</b>	Atomic Force Microscopy (Atomkraftmikroskopie)
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>α</b>	griech.: „alpha“
<b>BPA</b>	engli.: „bloodstain pattern analysis“ (Blutspurenmusteranalyse)
<b>β</b>	griech.: „beta“
<b>DNA</b>	engl.: „deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
<b>ESR</b>	Elektronenspinresonanz
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	zweiwertiges Eisen
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	dreiwertiges Eisen
<b>GOT</b>	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Enzym)
<b>GPT</b>	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Enzym)
<b>H<sup>+</sup></b>	Wasserstoff-Ion
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>Hb</b>	Hämoglobin
<b>HbO<sub>2</sub></b>	Oxyhämoglobin
<b>HC</b>	Hämichrom



---

<b>HPLC</b>	engl.: „englisch high performance liquid chromatography“ (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase (Enzym)
<b>MethHb</b>	Methämoglobin
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mRNA</b>	engl.: „messenger ribonucleic acid“ (Boten-Ribonukleinsäure)
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>NADPH</b>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (Koenzym)
<b>nm</b>	Nanometer
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>O<sub>2</sub>-</b>	Superoxid
<b>pH</b>	lat.: „pondus Hydrogenii“ (Wasserstoffgehalt)
<b>RNA</b>	engl.: „ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
<b>tRNA</b>	engl.: „transport ribonucleic acid“ (Transport-Ribonukleinsäure)
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VIS</b>	engl.: „visible“ (sichtbar)
<b>WL</b>	Wellenlänge

°C            Grad Celsius

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Blutbestandteile</b> .....	4
<b>Abbildung 2: Strukturformel des Hämoglobins</b> .....	6
<b>Abbildung 3: Konformationsänderung des Hämoglobins</b> .....	7
<b>Abbildung 4: Blutabbau in vivo</b> .....	13
<b>Abbildung 5: Blutabbau ex vivo</b> .....	14
<b>Abbildung 6: Aufbau eines Einstrahl-Spektrophotometers</b> .....	16
<b>Abbildung 7: Aufbau eines Zweistrahl-Spektrophotometers</b> .....	17
<b>Abbildung 8: Spektrophotometer Shimadzu UV-1800</b> .....	21
<b>Abbildung 9: Vorbereitete Blutproben</b> .....	24
<b>Abbildung 10: Normierte Spektren aller Messpunkte</b> .....	28
<b>Abbildung 11: Normiertes Spektrum vom 31.05.2022</b> .....	32
<b>Abbildung 12: Normiertes Spektrum vom 01.06.2022</b> .....	33
<b>Abbildung 13: Normiertes Spektrum vom 02.06.2022</b> .....	34
<b>Abbildung 14: Normiertes Spektrum vom 07.06.2022</b> .....	35
<b>Abbildung 15: Normiertes Spektrum vom 17.06.2022</b> .....	36
<b>Abbildung 16: Normiertes Spektrum vom 22.06.2022</b> .....	37
<b>Abbildung 17: Normiertes Spektrum vom 28.06.2022</b> .....	38
<b>Abbildung 18: Normiertes Spektrum vom 05.07.2022</b> .....	39
<b>Abbildung 19: Normiertes Spektrum vom 12.07.2022</b> .....	40
<b>Abbildung 20: Normierte Spektren aller Messpunkte mit Zoom auf 400 nm - 630 nm</b> .....	44

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Übersicht der Programme, die für die Durchführung und Auswertung der Experimente verwendet wurden. ....</b>	<b>22</b>
<b>Tabelle 2: Temperatur und Luftfeuchte zum Zeitpunkt der spektroskopischen Messungen .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 3: Datum und Uhrzeit der spektroskopischen Messungen sowie die gesamte Liegedauer in Stunden .....</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 4: Peak-Standorte von Oxyhämoglobin und Hämichrom .....</b>	<b>29</b>
<b>Tabelle 5: Peak-Standorte Methämoglobin.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabelle 6: Peak-Standort Globin .....</b>	<b>31</b>

# 1 Einleitung

Der Ausdruck „Forensik“ hat seinen Ursprung im antiken Rom. Dort haben unter anderem Gerichtsverfahren, Urteilsverkündungen oder -vollstreckungen auf dem öffentlichen Marktplatz (lat. forum) stattgefunden. Heutzutage vereint dieser Begriff sämtliche Tätigkeiten, die sich mit der systematischen Identifikation, Analyse und Rekonstruktion krimineller Handlungen befassen. [1]

## 1.1 Motivation

Im Rahmen der forensischen Tatortarbeit gehört die Analyse von Blutspuren zu einer der wichtigsten Aufgaben. Sie können hinsichtlich verschiedener Eigenschaften untersucht werden. Durch eine DNA-Analyse des Blutes ist es möglich, Personen zu identifizieren oder die Anzahl der Tatbeteiligten zu ermitteln. Auch in Bezug auf ihre Form und Verteilung können Blutspuren untersucht werden. Diese morphologische Analyse ist unter anderem bekannt als Blutmusteranalyse. Sie dient der Rekonstruktion des Tatgeschehens. [2]

Eine weitere Untersuchungsmöglichkeit ist die Blutaltersbestimmung. Damit kann unter anderem eine Eingrenzung der Tatzeit erfolgen. Für den Fall, dass mehrere Blutspuren an einem Tatort existieren, können diese außerdem hinsichtlich ihrer Entstehungszeit untersucht werden. Dadurch können nicht relevante Spuren erkannt und von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Schon seit Beginn des 20. Jahrhunderts beschäftigen sich Wissenschaftler mit dieser Thematik und versuchen eine geeignete Methode zur Altersbestimmung einer Blutspur zu entwickeln. Zwar wurden viele dieser Verfahren im Laufe der Zeit verbessert, jedoch konnte trotz des technischen Fortschritts bisher keine Technik so optimiert werden, dass sie für die forensische Tatortarbeit anwendbar wäre. Die meisten dieser Methoden sind entweder zu ungenau, nur während eines bestimmten Zeitraums zuverlässig oder zu kompliziert in ihrer Anwendung. [3]

## 1.2 Zielstellung

Im Rahmen des Studiengangs „Allgemeine und Digitale Forensik“ an der Hochschule Mittweida wurden schon viele Projekte zur forensischen Blutspuren- und -musteranalyse durchgeführt. Eine aktuelle Studie basiert auf der Forschungsarbeit, die 1997 von Andrasko publiziert wurde. Er untersuchte alternde Blutspuren mittels HPLC-Analyse und stellte dabei fest, dass sich über die Zeit bestimmte Peaks bilden. Nimmt ein Peak über das Alter zu, bedeutet das, dass eine Substanz aufgebaut wird. [4]

Das Ziel der aktuellen Forschung in Mittweida ist es, herauszufinden welcher Stoff sich hinter diesem Peak verbirgt. Dazu habe ich mich bereits während meines Praxismoduls intensiv mit dem Blutalterungsprozess sowohl innerhalb als auch außerhalb des menschlichen Körpers beschäftigt. Dabei ist aufgefallen, dass dieser Ablauf *in vivo* gut erforscht und aufgeklärt ist. Wie dieser Prozess *ex vivo* abläuft, ist ebenfalls grob geklärt. Aus dem roten Blutfarbstoff Hämoglobin entsteht im Laufe der Zeit Hämichrom. Das Ziel der meisten wissenschaftlichen Arbeiten auf diesem Gebiet ist es, eine für die Praxis geeignete Methode zur Blutaltersbestimmung zu finden. Dabei wurde jedoch noch nicht untersucht, ob und wie sich das Hämichrom mit zunehmendem Alter weiter zersetzt. Deshalb beschäftigt sich diese Bachelorarbeit mit der Thematik.

Dafür wurden Blutspuren über einen Zeitraum von sechs Wochen sowohl spektroskopisch als auch mikroskopisch untersucht.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Funktionen des Blutes

Das Blut ist ein flüssiges Gewebe, das eine Vielzahl an lebensnotwendigen Aufgaben übernimmt. Dazu gehören neben dem Stofftransport, der Immunabwehr und der Gerinnungsfunktion auch die Regulation des Säure-Basen-Gleichgewichts und der Temperatur. [5]

Während des Stofftransportes befördert Blut diverse Moleküle und Zellen. Es bindet zum einen den über die Lunge aufgenommenen Sauerstoff und transportiert diesen zu den peripheren Geweben, um diese zu versorgen. Anschließend wird dort entstandenes Kohlenstoffdioxid wieder zurück zur Lunge befördert und kann somit über die Atemluft abtransportiert werden. Neben den Atemgasen werden die Organe vom Blut auch mit Nährstoffen versorgt. Diese werden von ihren Speicher- bzw. Resorptionsorten zu den Orten, an denen sie verbraucht werden, transportiert. Die Stoffwechsel- und -zwischenprodukte, auch Metaboliten genannt, befördern das Blut dann von dort aus unter anderem zu den Ausscheidungsorganen. Auch Hormone, Mineralstoffe und Vitamine werden von dem roten Lebenssaft im Körper verteilt. [5]

Um die wichtige Aufgabe der Wärmeregulation zu erfüllen, verteilt das Blut die Wärmeenergie, die während der Stoffwechselprozesse entsteht. Anschließend sorgt es dafür, dass diese Wärme beispielsweise über die Haut aus dem Körper befördert wird. Somit wird die Körpertemperatur konstant auf ca. 37 °C gehalten. [5]

Neben der Temperatur werden noch weitere chemische und physikalische Merkmale des Blutes, wie zum Beispiel die Konzentration gelöster Stoffe oder der pH-Wert, regelmäßig überprüft und ggf. korrigiert. Dadurch bleibt die Homöostase erhalten. [5]

Eine weitere bedeutende Aufgabe ist die Blutstillung, auch Gerinnungsfunktion genannt. Während der primären und sekundären Hämostase kann Blut die entstehende Hämorrhagie langsam durch Gerinnung stoppen und die verletzten Gefäße im Anschluss wieder abdichten und verschließen. [5]

Eine andere wichtige Funktion des Blutes ist die Abwehrfunktion. Dabei werden vom Organismus aufgenommene Fremdkörper und Krankheitserreger unschädlich gemacht. Man unterscheidet hierbei zwischen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr. Bei der spezifischen Immunantwort werden individuelle Strukturen an der Oberfläche des Krankheitserregers, die Antigene, erkannt. Diese werden entweder durch Antikörper oder Rezeptoren an der Lymphozytenoberfläche gebunden und somit unschädlich

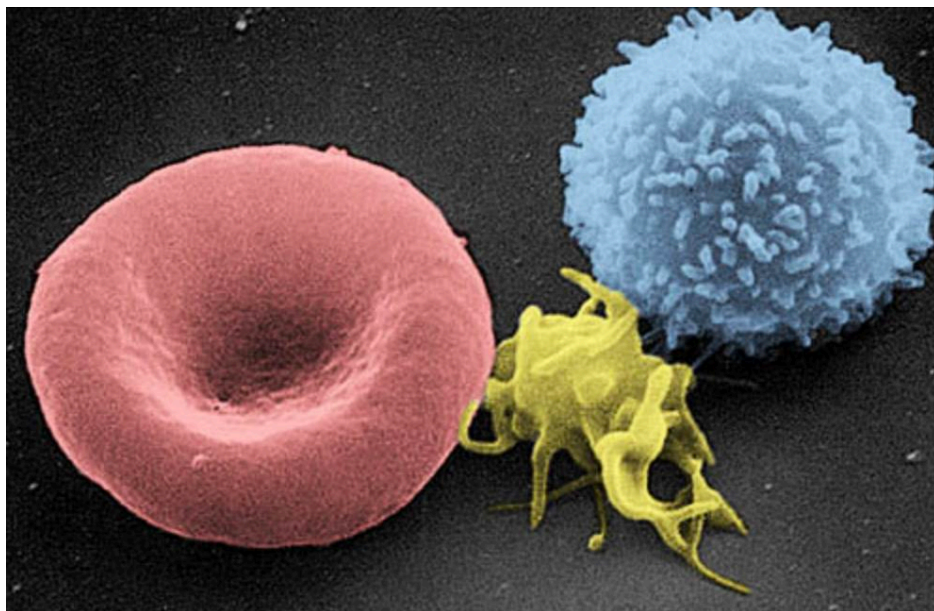
gemacht. Bei der unspezifischen Immunabwehr werden die Krankheitserreger durch Makrophagen aufgenommen, phagozytiert und intrazellulär verdaut. [5]

Das Blutvolumen eines erwachsenen Menschen beträgt ca. 5 Liter. Das entspricht etwa 6-8% des gesamten Körpergewichts. Bei Kindern sind es 8-9%. Neben der Temperatur und dem Blutvolumen gibt es weitere physikalische Merkmale, wie zum Beispiel Hämatokrit und Blutviskosität, die stark voneinander abhängen und je nach Alter und Geschlecht variieren. [5]

Als Hämatokrit wird der Anteil der Erythrozyten am Gesamtblut bezeichnet. Bei einer gesunden Frau beträgt dieser etwa 42%, bei Männern ca. 47%. Der Hämatokrit von Neugeborenen ist durchschnittlich 20% höher als bei erwachsenen Frauen, wohingegen der von Kleinkindern etwa 10% niedriger als der Wert der Frauen ist. Die relative Viskosität des Blutes, bezogen auf Wasser, beträgt bei Erwachsenen 3,5 bis 5,4. Mit steigendem Hämatokrit nimmt diese Blutviskosität überproportional zu. [5]

## 2.2 Zusammensetzung des Blutes

Blut setzt sich aus dem Blutplasma und den Blutzellen zusammen. In den folgenden Abschnitten werden diese Bestandteile sowie deren Zusammensetzung näher beleuchtet. [5]



**Abbildung 1: Blutbestandteile**

Diese Abbildung zeigt die drei zellulären Blutbestandteile. Links in rot ist ein Erythrozyt zu sehen. In der Mitte ist ein gelber Thrombozyt zu erkennen und rechts in blau ist ein Leukozyt dargestellt. [6]



### 2.2.1 Erythrozyten

Mit 99% bilden die 7µm großen Erythrozyten den größten Anteil der Blutzellen. Sie sind primär für den Atemgastransport im Körper zuständig. Zur Bewältigung dieser Aufgabe beinhalten sie Hämoglobin. Dieser eisenhaltige Proteinkomplex ist in der Lage, Sauerstoff reversibel zu binden. Außerdem ist er neben seiner Beteiligung am Rücktransport von Kohlendioxid für die rote Färbung der Erythrozyten verantwortlich. Deren bikonkave Scheibenform erleichtert ihnen die Aufgabe des Atemgasaustauschs. Eine weitere besondere Eigenschaft der roten Blutkörperchen ist ihre Flexibilität, die sie den strukturellen Merkmalen ihres Zytoskeletts und ihrer Plasmamembran zu verdanken haben. Mit fortschreitendem Alter nimmt diese Verformbarkeit ab. Erythrozyten zirkulieren etwa 120 Tage im Blut. Anschließend werden sie von Zellen der Milz, der Leber und des Knochenmarks phagozytiert. Zudem besitzen sie keinen Zellkern oder andere Organelle, weshalb sie ausschließlich durch anaerobe Glykolyse ATP gewinnen können. [7]

### 2.2.2 Leukozyten

Die Leukozyten sind ein weiterer zellulärer Bestandteil des Blutes. Sie besitzen einen Zellkern und sind für die Immunabwehr zuständig. Zudem differenzieren sie sich durch ihre Größe, Farbe und Anzahl von den Erythrozyten. Die weißen Blutkörperchen sind im Durchschnitt etwa doppelt so groß. Dafür ist ihr Anteil im Blut viel geringer (ca. 1%). Sie lassen sich in drei Gruppen einteilen: Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Häufig erfolgt eine weitere Einteilung der Granulozyten in Neutrophile, Eosinophile und Basophile, basierend auf der unterschiedlichen Färbereaktion ihrer Granula. Neutrophile nehmen bakterielle Krankheitserreger auf und bekämpfen diese. Nicht phagozytierbare Parasiten werden von den Eosinophilen abgewehrt. Die Monozyten können sich im Gewebe unter anderem zu Makrophagen entwickeln. Ähnlich wie die neutrophilen Granulozyten phagozytieren sie Krankheitserreger. Anstatt jedoch zu sterben, zeigen die Makrophagen anschließend deren Antigene an ihrer Oberfläche. Die Lymphozyten können nochmals in B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unterschieden werden. Beide haben die Aufgabe potenzielle Fremdartigene zu erkennen. Die Lebensdauer der Leukozytenarten ist sehr unterschiedlich und reicht von wenigen Tagen bis hin zu mehreren Jahren. Gealterte Zellen werden in den Geweben durch Makrophagen abgebaut. [8, 9]

### 2.2.3 Thrombozyten

Die letzte Gruppe der Blutzellen sind die Thrombozyten. Ähnlich wie die Erythrozyten haben sie keinen Zellkern, besitzen aber Mitochondrien und Sekretgranula. Sie haben einen Durchmesser von 1-4  $\mu\text{m}$  und sind damit die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Blutgerinnung. Die Blutplättchen haben eine Lebensdauer von 5-11 Tagen und werden nach dieser Zeit von Milz, Leber und Lunge abgebaut. [8, 10]

### 2.2.4 Hämoglobin

Wie bereits im Abschnitt 2.2.1 erwähnt, ist Hämoglobin ein wichtiger Bestandteil der Erythrozyten. Es setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, die jeweils aus einer Polypeptidkette (Globin) und einer Hämgruppe bestehen. Bei einem erwachsenen Menschen tritt am häufigsten die Hämoglobinform  $\text{HbA}_0$  auf. Diese setzt sich aus jeweils zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinketten, die sich in der Anzahl und Reihenfolge ihrer Aminosäuren unterscheiden, zusammen. Das Häm besteht aus vier Pyrrolringen, die über Methinbrücken miteinander verbunden sind und somit einen Porphyrinring bilden. Über ihre vier Stickstoffatome binden sie im Zentrum ein zweifach positiv geladenes Eisenion ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

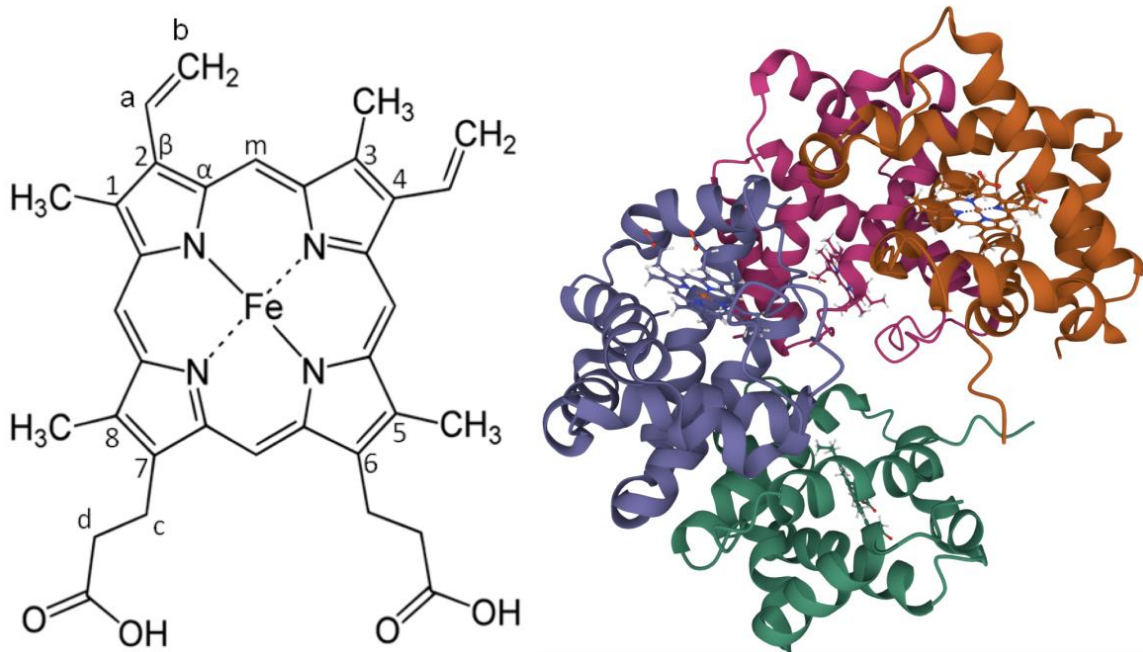
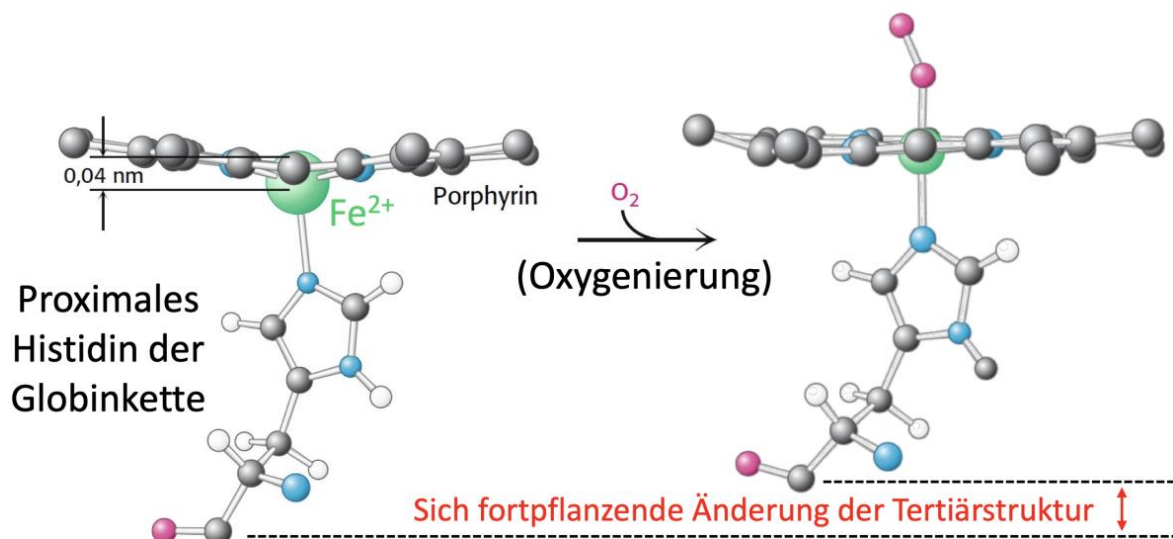


Abbildung 2: Strukturformel des Hämoglobins

Links: Strukturformel des Häms bestehend aus einem Porphyrinring gebunden an ein zentrales Eisenatom [11] Rechts: 3D - Modell eines Hämoglobin-Moleküls bestehend aus vier Globinketten (lila, grün, orange, rosa), die jeweils an eine Hämgruppe gebunden sind. [12]

Das Hämoglobin liegt *in vivo* als sauerstoffarmes Desoxyhämoglobin (Hb) oder als sauerstoffbeladenes Oxyhämoglobin (HbO<sub>2</sub>) vor. Desoxygeniertes Hämoglobin befindet sich im T-Zustand. Dabei liegt das Fe<sup>2+</sup> außerhalb der Hämebene. Bindet sich ein Sauerstoffmolekül (O<sub>2</sub>) an das zentrale Eisenion, wandert es in die Hämebene hinein. Aufgrund des Strukturwechsels wird der Zustand von oxygeniertem Hämoglobin auch als R-Zustand bezeichnet. Der Prozess der Sauerstoffbindung ist als Oxygenierung bekannt und ist reversibel. Befindet sich Blut außerhalb des Körpers (*ex vivo*), findet eine Oxidation des HbO<sub>2</sub> statt und es entsteht Methämoglobin (MetHb). Während dieses Vorgangs wird aus dem Zentralatom Fe<sup>2+</sup> dreiwertiges Eisen (Fe<sup>3+</sup>). Der Transport von Sauerstoff ist an dieser Stelle nicht mehr möglich. Wird Methämoglobin innerhalb des Körpers gebildet, kann es durch Methämoglobinreduktase wieder zu Hämoglobin reduziert werden. Außerhalb des Körpers nimmt die Konzentration dieses Enzyms mit der Zeit ab, sodass eine solche Reduktion nicht mehr möglich ist. Dies hat zur Folge, dass MetHb *ex vivo* zu Hämichrom denaturiert wird. [13, 7, 3]



**Abbildung 3: Konformationsänderung des Hämoglobins**

Diese Abbildung zeigt links den T-Zustand des Hämoglobins, bei dem das Eisen (grün) außerhalb der Häm-Ebene liegt. Rechts ist der R-Zustand, mit dem Eisen innerhalb der Häm-Ebene, dargestellt. [14]

## 2.2.5 Blutplasma

Das Blutplasma ist eine gelblich-klare Flüssigkeit, die größtenteils aus Wasser besteht. Darin sind Stoffe wie zum Beispiel Elektrolyte und Plasmaproteine gelöst. Zu den Plasmaproteinen gehören unter anderem Albumin und diverse Globuline, aber auch Lipoproteine und Akute-Phase-Proteine. Jedes dieser Proteine erfüllt eine andere Funktion. Sie sind beispielsweise am Transport der Nährstoffe und Metabolite, der Immunreaktion oder der Blutgerinnung beteiligt. Gemeinsam erzeugen sie den kolloidosmotischen

Druck und tragen so zur Aufrechterhaltung eines gleichbleibenden Blutvolumens bei. [13, 15]

## 2.3 Blut in der Forensik

Die forensischen Arbeitsbereiche sind vielfältig und lassen sich in verschiedene Teilgebiete gliedern. Dazu gehört unter anderem die forensische Serologie. Dabei werden Sekrete, wie zum Beispiel Blut, molekularbiologisch untersucht. [16]

Im nächsten Abschnitt wird die Bedeutung des Blutes als forensische Spur näher beschrieben.

### 2.3.1 Spurenbegriff

Im Jahre 1920 formulierte *Edmond Locard* in seinem Buch „The criminal investigation and scientific methods“ das heute sogenannte Locard'sche Austauschprinzip. Dieses drückt aus, dass jeglicher Kontakt zwischen zwei Objekten beidseitig Spuren zurücklässt. Zwischen Täter, Opfer und Tatort findet demzufolge ein Austausch physischer Spuren statt, wodurch eine objektive Rekonstruktion des Tathergangs realisiert werden kann. [16]

Unter dem Begriff „Spur“ versteht man in der Forensik jegliche materiellen Veränderungen, die mit einem kriminalistisch relevanten Vorfall in Verbindung stehen und einen Beitrag zur Aufklärung einer Straftat leisten können. [2]

Neben den tatrelevanten Spuren, die im Zusammenhang mit der kriminellen Handlung entstanden sind, gibt es außerdem Trugspuren und fingierte Spuren. Erstere stehen mit der Begehung der Straftat nicht in Verbindung, sondern wurden unabsichtlich von Tatbeteiligten oder -unbeteiligten verursacht. Im Gegensatz dazu wurden fingierte Spuren bewusst gelegt, mit der Absicht die Ermittler zu täuschen. Es ist zwingend notwendig, dass diese beiden Spurenarten berücksichtigt und im besten Fall erkannt werden. [2]

Die tatrelevanten Spuren lassen sich wie folgt differenzieren:

- Materialspuren (stoffliche Merkmale und deren Zuordnung, z.B. Blutspuren oder Haare)
- Formspuren (Form der Spur, wie z.B. Blutspritzmuster)
- Situationsspuren (Lage von Gegenständen/Spuren zueinander bzw. zur Umgebung, wie die Stellung von Türen/Fenstern)

- Gegenstandsspuren (beweiserhebliche Gegenstände und die Objekte, die sich darauf befinden) [2]

Ein Beispiel für die Auswertung von Blut als Formspur ist die Blutspurenmuster-Verteilungsanalyse, auch bekannt als bloodstain pattern analysis (BPA). Darunter werden die Dokumentation, Klassifizierung und Interpretation der Blutspuren verstanden. Diese werden dafür im Hinblick auf ihre Größe, Form und Verteilung systematisch untersucht. Nach Abschluss einer solchen Analyse können unter anderem Aussagen über die Anzahl, Art, Intensität, Richtung und Herkunft der Gewalteinwirkungen getroffen werden. Des Weiteren lassen sich die Ereignisse sowohl zeitlich als auch räumlich einordnen. Es können außerdem weitere tatabhängige Detailfragen im Rahmen dieser Untersuchung geklärt werden. [2]

Die Klassifizierung der Blutspur kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Die aktuell gebräuchlichste Methode ist die Differenzierung der Blutspur anhand ihrer Verteilungsmusteranalytik. Dabei erfolgt eine Einteilung in eine der folgenden vier Gruppen:

- Passive Spuren (werden nicht durch aktive Einwirkung verursacht - Abtropfspur, Ablaufspur, Blutlache)
- Kontaktsuren (entstehen durch Berührung zweier Objekte, von denen eins beblutet ist - (Durch-)Wischspur, Abdruckspur)
- Projektionsspuren (entstehen durch aktives Beschleunigen von Blut auf eine Oberfläche - Schleuderspur, Spritzspur)
- Verschiedene (lassen sich nicht eindeutig zu den oberen drei Kategorien zuordnen/Sonderformen - Insektenspur, Spritzerschatten, Blasenringe) [17]

## 2.4 Blutaltersbestimmung

Neben dieser morphologischen Analyse ist auch eine Untersuchung der Blutspuren im Hinblick auf ihr Alter sinnvoll, um beispielsweise die Tatzeit einzugrenzen. Schon seit über 100 Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Ermittlung des Blutalters.

Im Jahr 1901 führte *Ziemke* erste Analysen zu den unterschiedlichen Absorptionsbanden von Hämoglobinderivaten durch und legte damit den Grundstein für die wissenschaftliche Blutaltersbestimmung. [3] 1907 entwickelte *Tomellini* eine Farbskala, um verschiedene Stufen des Blutalters darzustellen. Die Farbtöne dieser Skala wurden mit zunehmendem Alter immer dunkler. [3] Auch *Leers* befasste sich mit dieser Farbänderung und erkannte drei Jahre später, dass diese durch die Zersetzung von Hämoglobin im Laufe der Zeit verursacht wird. [18] Im Jahr 1930 stellte *Schwarzacher* fest, dass die Lösungsfähigkeit von Blut in Wasser mit zunehmendem Alter abnimmt. [19] 1951

beschäftigte *Rauschke* sich mit der Farbveränderung des Blutes während des Alterungsprozesses und erkannte deren chemischen Hintergrund. [20] Neun Jahre später führte Patterson die ersten spektrometrischen Analysen von Blut durch. Dabei stellte er fest, dass sich Umwelteinflüsse auf den Alterungsprozess einer Blutspur auswirken. [21] *Kleinhauer et al.* und *Kind et al.* entwickelten diese Methode in den folgenden Jahren weiter. [22, 23] Allerdings hat sich nach einer sorgfältigen Prüfung dieser Methoden herausgestellt, dass diese sich nicht für die zuverlässige Beurteilung des Blutalters eignen. [3]

Im Laufe der Zeit wurden viele verschiedene Techniken zur Bestimmung des Blutalters entwickelt. Diese können anhand der dabei analysierten Blutbestandteile unterschieden werden. Die gängigsten Methoden beschäftigen sich mit den Erythrozyten, den Leukozyten oder dem Blutplasma. Im Folgenden werden einige aktuelle Verfahren aufgeführt und kurz beschrieben.

Für die Untersuchung der roten Blutkörperchen wird beispielsweise die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) verwendet. Mit Hilfe dieser Trenntechnik lassen sich die einzelnen Bestandteile einer Lösung erkennen und quantifizieren. Das ist besonders für die Bestimmung der Hämoglobinderivate von Bedeutung. [24]

Eine weitere Untersuchungsmethode basiert auf dem Ansatz, mittels Reflexions-Spektroskopie das Alter eines Blutflecks mit seiner Farbe in Verbindung zu setzen. Da die Farbumwandlung von Rot nach Braun in einem Spektralbereich von 450 bis 700 nm stattfindet, wird oftmals dieser Bereich für solche Analysen verwendet. [25, 26, 27]

Der Gebrauch von Sauerstoffelektroden ist eine weitere Möglichkeit Erythrozyten hinsichtlich ihrer Alterung zu untersuchen. Dafür wird mit Hilfe der O<sub>2</sub>-Elektroden die Menge an Oxyhämoglobin ermittelt. Danach wird die Zerfallsrate von HbO<sub>2</sub> gemessen, wodurch sich ein Zusammenhang mit dem Alter der Blutspur herstellen lässt. [28]

Die Elektronenspinresonanz (ESR) ist eine weitere Untersuchungstechnik. Dafür wird im Hämoglobinmolekül der Spin-Zustand des Eisenions gemessen. Da dieser sich im Laufe der Zeit mit zunehmender Denaturierung des Hämoglobins verändert, lässt sich auf diese Art das Blutalter bestimmen. [29]

Neben diesen Verfahren ist es außerdem möglich eine Oberflächenanalyse zur Bestimmung des Blutalters durchzuführen. Die Atomic Force Microscopy (AFM) versetzt dafür ein Cantilevers in Schwingung, bewertet dessen Resonanzfrequenz und ermittelt so die Elastizität der Erythrozyten-Oberfläche. [30]

Ein Ansatz, der auf der Untersuchung von Leukozyten basiert, beschäftigt sich mit der Veränderung des Verhältnisses zwischen mRNA und tRNA in den weißen

Blutkörperchen. Dadurch lässt sich das Färbealter berechnen. Diese Methode kann nach einem Monat seit der Entstehung des Blutflecks angewendet werden. [31]

Andere Techniken verwenden Bestandteile des Blutplasmas zur Bestimmung des Blutalters. Ein gängiger Ansatz beschäftigt sich mit dem Konzentrationsabbau der Plasmaproteine im Blut. *Rajamannar* beobachtete in seiner Studie, dass in frischen Blutflecken alle Plasmaproteine vorhanden sind. In den ersten 15 Tagen zersetzen sich Albumin und die  $\alpha$ -Globuline. Anschließend nahm die Konzentration der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline ab. Nach einem Jahr waren keine Globuline mehr vorhanden. [32]

Eine weitere Methode ist die UV-Absorptionsphotometrie. Dabei wird die Aktivität verschiedener Enzyme, wie beispielsweise Laktatdehydrogenase (LDH), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), nachgewiesen. [33]

Ein anderes Verfahren beschäftigt sich mit dem Verhältnis verschiedener Aminosäuren. Das kann mittels Asparaginsäure-Racemisierung gemessen werden. Aufgrund der langsamen Zerfallsraten des Aminosäureabbaus eignet sich diese Methode besonders für die langfristige Blutaltersbestimmung. [34]

Mit einer weiteren Methode, die sich mit dem Verhältnis der Hormone Melatonin und Cortisol beschäftigt, kann die Tageszeit, zu der die Blutspur entstanden ist, ermittelt werden. Dafür verwendeten *Ackermann et al.* enzymgebundene Immunosorbent-Assays. Die Konzentration von Melatonin erreicht spät in der Nacht ihren Höchstwert. Cortisol erreicht diesen am Morgen. [35]

All diese Techniken wurden von *Bremmer et al.* 2012 in einer Studie überprüft und miteinander verglichen. In dieser Arbeit wurden die Methoden hinsichtlich verschiedener Merkmale bewertet. Einer dieser Kritikpunkte war die Ungenauigkeit der Ergebnisse. Dabei wurde festgestellt, dass sich alle Ansätze noch in der Entwicklungsphase befinden und deshalb für die Anwendung in der forensischen Praxis ungeeignet sind. Die Ergebnisse der Altersschätzungen sind noch zu ungenau. Hinzu kommt, dass bei den meisten Verfahren diese Ungenauigkeit mit zunehmendem Alter der Blutspur noch größer wird. [3]

Auch hinsichtlich ihrer Invasivität wurden die verschiedenen Methoden bewertet. Dazu wurden sie in drei verschiedene Kategorien eingeteilt. Nicht-invasive Techniken sind direkt am Tatort anwendbar. Eine Vorbereitung der Blutprobe ist nicht notwendig. Dies ist auch bei minimal-invasiven Verfahren der Fall. Allerdings ist hier ein Transport der Probe ins Labor erforderlich. Für die Anwendung intensiv-invasiver Methoden müssen die Blutproben vor dem Transport ins Labor vorbereitet werden. Durch eine solche Vorbereitung kann die Untersuchung der Probe nur einmal durchgeführt werden. [3]

Die am wenigsten invasive Methode ist die Reflexions-Spektroskopie. Allerdings kann eine erfolgreiche Altersbestimmung nur dann erfolgen, wenn sich die Blutspur auf einem weißen Hintergrund befindet. Die AFM ist ein minimal-invasives Verfahren. Doch auch hier gibt es Einschränkungen im Anwendungsbereich. Es ist notwendig, dass die Hintergrundfläche der Blutspur eben ist. Somit beschränkt sich dieses Verfahren der Altersbestimmung auf Blutspuren, die sich auf Fliesen, Glas oder ähnlichem befinden. Die Proben für ESR-Messungen müssen vor dem Transport ins Labor nicht direkt vorbereitet werden. Es ist lediglich eine Abkühlung des Blutflecks und des Substrats auf  $-196^{\circ}\text{C}$  notwendig, was die Durchführung mehrerer Messungen derselben Probe nicht ausschließt. Zudem scheint dieses Verfahren sowohl für kurz- als auch für langfristige Altersbestimmungen geeignet zu sein. Zu den intensiv-invasiven Methoden zählen beispielsweise die HPLC und die Verwendung von Sauerstoffelektroden. Für beide Techniken muss der Blutfleck aufgelöst werden. [3]

## 2.5 Blutabbau

### 2.5.1 *in vivo*

In der Fachliteratur wird der Abbau des Blutes häufig mit dem Hämoglobinabbau in Verbindung gebracht. Zudem stützen sich die meisten Methoden zur Blutaltersbestimmung auf den Abbau der Erythrozyten. Aus diesem Grund wurde zur Erarbeitung einer Übersicht des Blutabbauprozesses das Hauptaugenmerk auf den Erythrozytenabbau gelegt.

Die Membran-Glykoproteine der roten Blutkörperchen verlieren im Laufe ihrer Lebenszeit ihre terminalen Neuraminsäurereste und es lagern sich vermehrt IgG an. Dadurch verändert sich die Oberflächenstruktur der Erythrozytenmembran, die nun wie ein Signal für die Makrophagen der Milz und der Leber wirkt. Daran erkennen sie gealterte Erythrozyten und bauen diese mittels Phagozytose ab. Dafür werden zunächst die Globinketten des Hämoglobins zu ihren Aminosäuren abgebaut. Dies geschieht durch Proteasen. Die Aminosäuren werden dann entweder durch Desaminierung weiter abgebaut oder für die Synthese neuer Proteine verwendet. [36]

Der Abbau des Häms findet im endoplasmatischen Retikulum der Makrophagen statt. Dabei wird als erstes sein Tetrapyrrolring an einer Methinverbindung durch eine Hämoxygenase geöffnet. Durch diese  $\text{O}_2$  und  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -abhängige Reaktion wird das rote Häm in grünes Biliverdin umgewandelt. Das dabei freiwerdende Eisenion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oxidiert mit Ceoruloplasmin zu  $\text{Fe}^{3+}$ . Das wird anschließend in basischen Isoferritinen zwischengespeichert. Daraus kann das an Ferritin gebundene Eisen wieder in den Kreislauf abgegeben werden. Dort bindet es sich an Transferrin, wird zum Knochenmark transportiert und kann somit in ein neues Hämolekül eingebaut werden. Auch



Kohlenmonoxid wird bei der Hämoxigenase-Reaktion freigesetzt und im Anschluss entweder ausgeatmet oder es reguliert als Botenstoff vaskuläre Funktionen. Im nächsten Schritt wird Biliverdin durch die Biliverdinreduktase unter der Verwendung von NADPH + H<sup>+</sup> zu orangegelben Bilirubin reduziert. Das verlässt im Anschluss das monozytäre Phagozytensystem (MPS). Dieses indirekte Bilirubin ist nur schwer in Wasser löslich und muss deshalb für seinen Weitertransport zur Leber an Albumin gebunden werden. Dort findet durch die Glucuronosyltransferase die Konjugation der freien Carboxylreste der Propionylgruppen mit Glucuronsäure statt. Es entsteht Bilirubinmono- bzw. -diglucuronid, auch bekannt als direktes Bilirubin. Diese Form ist wasserlöslicher und ausscheidungsfähig. Anschließend wird das direkte Bilirubin über den Gallengang in den Darm transportiert. Dort findet der weitere Abbau des Stoffes zu Stercobilinogen und Urobilinogen statt. Über den enterohepatischen Kreislauf gelangen davon etwa 20% zurück zur Leber. Die anderen 80% werden zu Stercobilin und Urobilin abgebaut. Durch diese Gallenfarbstoffe, erhalten die Fäzes ihre orangebraune Farbe. Wird viel Häm abgebaut, ist eine Ausscheidung von Urobilinogen über die Niere ebenfalls möglich. [36, 37]

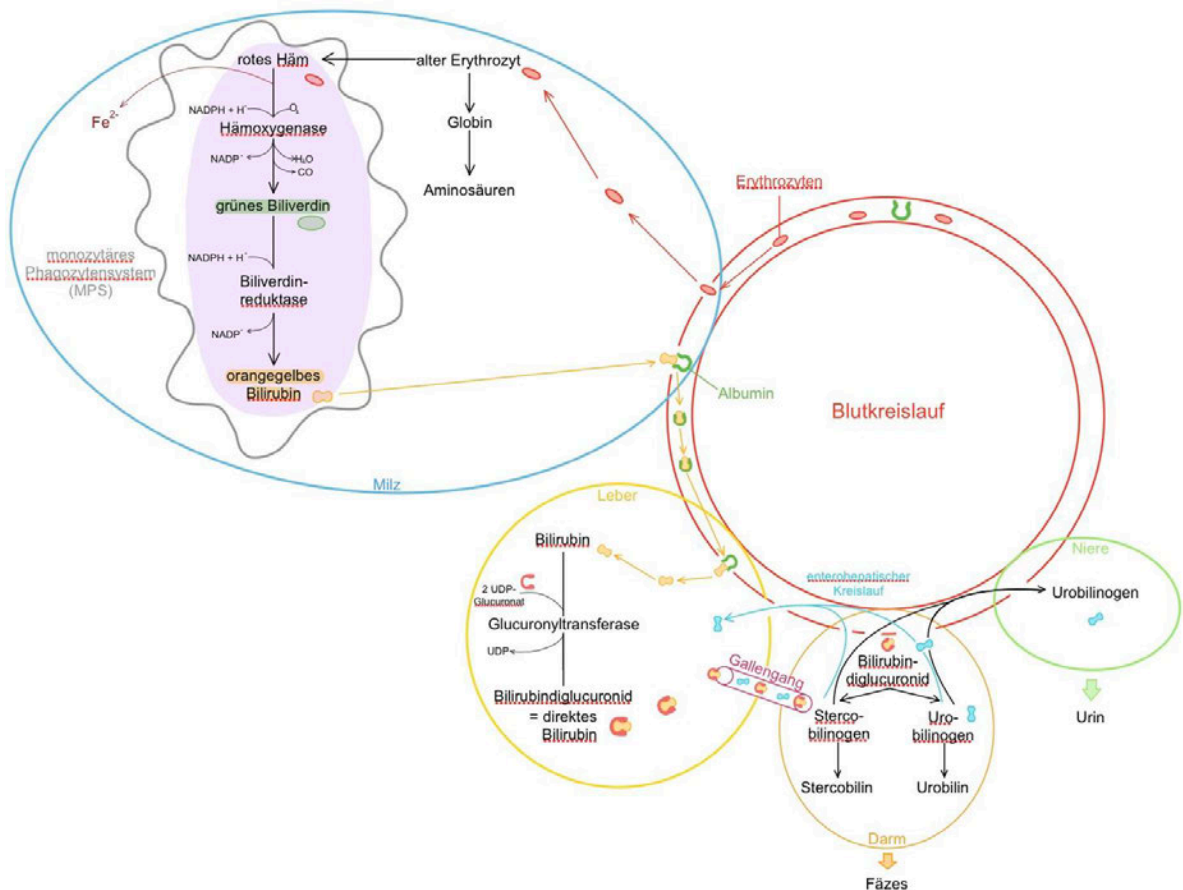


Abbildung 4: Blutabbau *in vivo*

Diese Abbildung stellt den Abbau des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin innerhalb des Körpers schematisch dar.

## 2.5.2 *ex vivo*

Tritt Blut aus dem Körper aus, wird das in den Erythrozyten enthaltene Desoxyhämoglobin in hellrotes Oxyhämoglobin umgewandelt. Das passiert aufgrund des vielen Sauerstoffs, der außerhalb des Körpers zur Verfügung steht. Während der Oxygenierung bindet sich ein  $O_2$ -Molekül an das zentrale Eisenatom. Im Desoxyhämoglobin befindet sich dieses Eisen etwa  $0,4 \text{ \AA}$  außerhalb des Protoporphyrinrings im T-Zustand. Diese Position schützt das Eisen vor oxidativen Schäden. Bei der Oxygenierung wird die Elektronendichte des Eisenions teilweise auf den Sauerstoff übertragen. Die damit einhergehende Verkleinerung des Eisens ermöglicht ihm die Verschiebung in die Hämebene. Anschließend oxidiert Oxyhämoglobin zu Methämoglobin. Bei dieser Autoxidation wird aus dem zweiwertigen Eisenion ( $Fe^{2+}$ ) dreiwertiges Eisen ( $Fe^{3+}$ ). Des Weiteren wird das gebundene  $O_2$  zu Wasser ( $H_2O$ ) reduziert. Dieses Wasser wird somit zum primären Liganden und ein Transport von Sauerstoff ist nicht mehr möglich. Neben dem braunen MetHb entsteht bei dieser Reaktion auch Superoxid ( $O_2^-$ ). Die Konzentration des MetHb im Blut erhöht sich stetig, bis alle Hämoglobine vollständig oxidiert wurden. Dieser Prozess dauert einige Tage bis wenige Wochen. Destabilisiert sich die Struktur des Globinanteils, lagert sich an die sechste Koordinationsposition des Eisenatoms entweder eine Aminosäure (meist Histidin) oder ein externer Ligand an. Durch diese Denaturierung wird die Hämgruppe inaktiv und es entsteht schwarzes Hämichrom (HC). [11, 38, 39, 40]

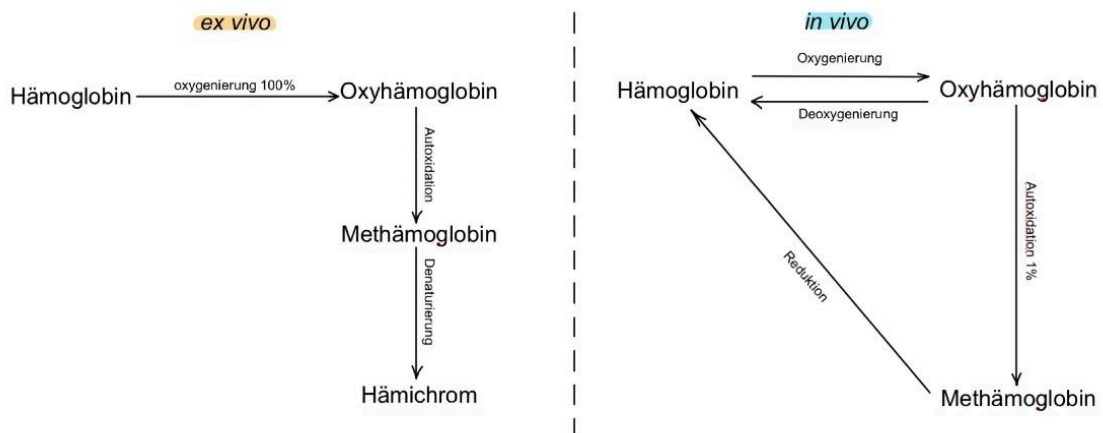


Abbildung 5: Blutabbau *ex vivo*

Diese Abbildung zeigt links den Abbau des Hämoglobins außerhalb des Körpers. Rechts sind ähnlich ablaufende Prozesse dargestellt, die während des Sauerstofftransportes *in vivo* ablaufen. Diese Grafik wurde mit der Apple-Software Notability erstellt (modifiziert nach [41]).

Nur wenn das zentrale Eisenatom der Hämgruppe im zweiwertigen Zustand vorliegt ( $Fe^{2+}$ ) ist eine Bindung mit Sauerstoff möglich. *Mansouri und Winterhalter* vermuteten, dass für die Stabilität der zweiwertigen Form die Umgebung des Häms von großer

Bedeutung ist. Damit begründeten sie die unterschiedlichen Oxidationsgeschwindigkeiten der Globinketten. Die Autoxidation der  $\alpha$ -Ketten läuft schneller ab als die der  $\beta$ -Ketten. Zudem zeigten die Beiden in ihrer Arbeit, dass die Oxidationsgeschwindigkeiten auch vom pH-Wert und vom Sauerstoffdruck abhängig sind. Eine Verringerung des Sauerstoffdrucks beschleunigte die Autoxidation der  $\beta$ -Ketten stärker als die der  $\alpha$ -Ketten. Die An- bzw. Abwesenheit von Liganden an den Hämebenen beeinflusst die Oxidationsgeschwindigkeiten ebenfalls sehr stark. [28]

*Bremmer et al.* stellten fest, dass die Oxidation von Oxyhämoglobin zu Beginn schnell abläuft, die Geschwindigkeit aber nach einigen Stunden abnimmt. Sie fanden außerdem heraus, dass Reaktionsgeschwindigkeiten von Oxyhämoglobin zu Methämoglobin und Hämichrom stark von der Temperatur abhängen. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Denaturierungsgeschwindigkeit von MetHb zu HC ist die Luftfeuchtigkeit. [40]

*Marrone und Ballantyne* nehmen an, dass bei der Oxidation von Oxyhämoglobin neben Methämoglobin ein weiterer Stoff, möglicherweise ein denaturiertes Hämoglobinderivat, entsteht. Sie fanden außerdem heraus, dass diese Umwandlung im trockenen Zustand schneller abläuft als im hydratisierten Zustand. [42]

## 2.6 UV/VIS-Spektroskopie

Wie bereits erwähnt, ist das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, wie sich die stoffliche Zusammensetzung des Blutes über einen längeren Zeitraum außerhalb des Körpers verändert. Für eine solche Untersuchung bot sich die spektroskopische Analysemethode an. Diese wird im folgenden Kapitel näher beleuchtet.

Werden Substanzen bestrahlt, können sie, abhängig von ihrer Zusammensetzung, Strahlen mit bestimmter Wellenlänge absorbieren (aufnehmen) oder Sekundärstrahlen emittieren (aussenden). Dieses Verhalten/diese Reaktion kann gemessen und anschließend als Kurve dargestellt werden. Eine solche Kurve wird auch als Spektrum bezeichnet. Dabei wird, je nach Entstehungsart, zwischen Absorptionsspektren und Emissionsspektren unterschieden. Die Ultraviolett-/Visible-Spektroskopie (UV/VIS), die sich vor allem für die Untersuchung organischer Stoffe eignet, gehört zu den Absorptionsspektren. Sie umfasst einen Strahlungsbereich von 200 bis 800 nm und analysiert die Wechselwirkung zwischen der Bestrahlung eines Moleküls und der von ihm aufgenommenen elektromagnetischen Strahlung. Durch die Bestrahlung werden im Molekül Elektronensysteme angeregt, die für diese Absorption verantwortlich sind. Mit Hilfe der gemessenen Absorption ist es möglich, die Konzentration in der Substanz zu

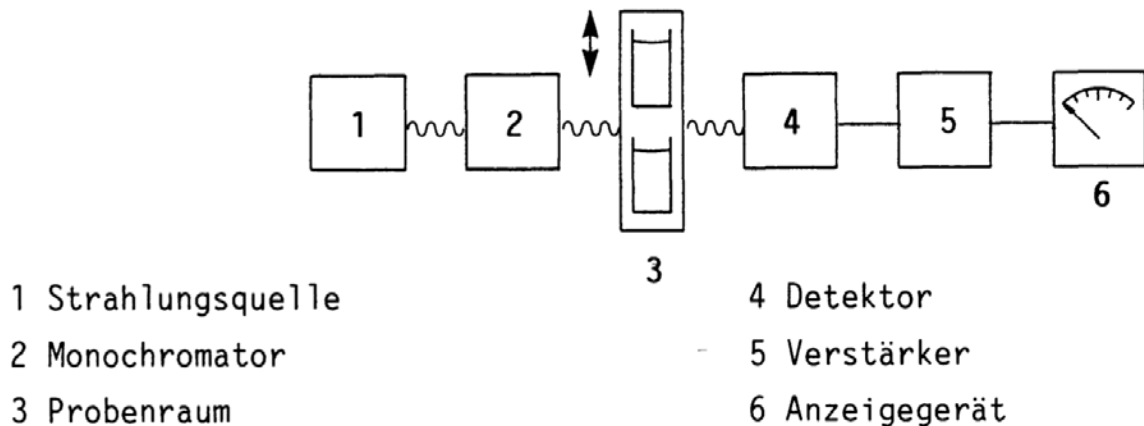
berechnen und anschließend eine quantitative Analyse der stofflichen Zusammensetzung durchzuführen. [43]

UV/VIS-Spektrophotometer werden in der Regel in Einstrahl-Spektrophotometer und Zweistrahl-Spektrophotometer unterschieden.

## 2.6.2 Einstrahl-Spektrophotometer

Proben, die spektroskopisch untersucht werden, sind immer in einem Lösemittel gelöst. Um genaue Messungen an einer Probe durchführen zu können, ist es notwendig die Eigenabsorption des Lösemittels zu eliminieren. Dazu wird bei Einstrahl-Spektrophotometern vor jeder Messung eine Referenzmessung nur mit dem Lösemittel durchgeführt. Erst wenn dieser Schritt erfolgt ist, kann die gelöste Probe gemessen werden. Um die Eigenabsorption des Lösemittels zu eliminieren und die Daten der zu untersuchenden Substanz zu erhalten, werden die Werte der Referenzmessung von denen der Probenmessung abgezogen. [43]

Die Bestandteile eines Einstrahl-Spektrophotometers sind in Abbildung 6 schematisch dargestellt.



**Abbildung 6: Aufbau eines Einstrahl-Spektrophotometers**

Diese Abbildung zeigt die Bestandteile eines Einstrahl-Spektrophotometers. Von der Strahlungsquelle (1) wird ein gleichmäßiges Spektrum erzeugt. Dahinter befindet sich der Monochromator (2). Das sind in der Regel Prismen, Filter oder Gitter, die eine monochromatische Strahlung erzeugen. Die Küvetten mit den Lösemitteln bzw. mit den Probelösungen werden in den Probenraum (3) gesteckt. Findet eine Messung statt, wird die aufgenommene Strahlung vom Detektor (4) in elektrische Signale umgewandelt. Diese Signale werden anschließend vom Verstärker (5) elektronisch verstärkt. Am Schluss zeigt das Anzeigegerät (6) die gemessenen Signale an. [43]

### 2.6.3 Zweistrahl-Spektrophotometer

Die Beseitigung der Eigenabsorption des Lösemittels funktioniert bei Zweistrahlgeräten anders. Hierfür werden zwei Küvetten in das Gerät eingesetzt. In einer befindet sich die aufgelöste Probe, in der anderen nur das Lösemittel. Die Lösungen in den beiden Küvetten werden gleichzeitig gemessen. Dazu werden der Probenstrahl und der Referenzstrahl durch einen Drehspiegel abwechselnd auf den Detektor gelenkt. Das Gerät vergleicht dabei ständig die Intensität der beiden Strahlungen miteinander und ist somit in der Lage, die Eigenabsorption des Lösemittels automatisch zu entfernen. [43]

In Abbildung 7 ist der Aufbau eines Zweistrahl-Spektrophotometer schematisch dargestellt:

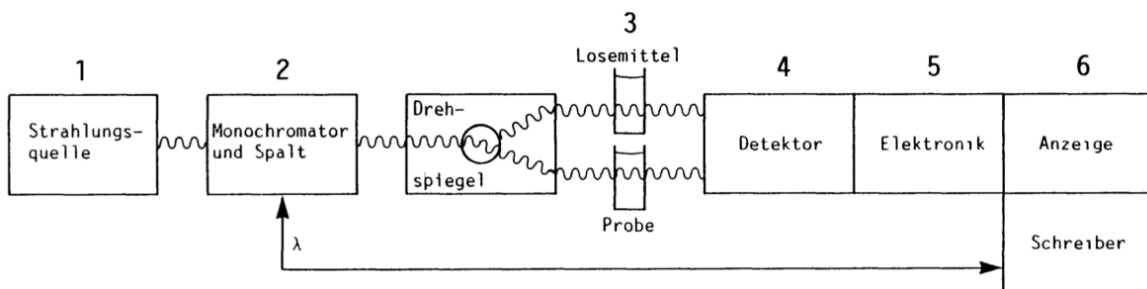


Abbildung 7: Aufbau eines Zweistrahl-Spektrophotometers

In dieser Abbildung sind der Aufbau und die Arbeitsweise eines Zweistrahl-Spektrophotometer schematisch dargestellt. Die Bestandteile 1-6 funktionieren wie bei einem Einstrahl-Spektrophotometer. [43]

### 2.6.4 Blutspektrum

Mit zunehmendem Alter verändert sich die Farbe des Blutes. Frisches Blut erkennt man unter anderem an seiner hellroten Farbe. Je älter das Blut wird, desto dunkler ist es. Diese Farbänderung ist auf die Konzentrationsänderungen der Hämoglobinderivate zurückzuführen. Aufgrund dieser Eigenschaft eignet sich eine spektroskopische Analyse des Blutes.

Wie bereits im Abschnitt 2.2.4 erwähnt, besteht Hämoglobin aus einem Porphyrinring, der an ein zentrales Eisenatom gebunden ist. Dieser Porphyrinanteil zeichnet sich im Blutspektrum durch eine Absorptionsbande, die sogenannte Soret-Bande, bei etwa 400 nm ab. [44]

Die Derivate des Hämoglobins besitzen ebenfalls charakteristische Peaks. Die für das Oxyhämoglobin typischen Banden liegen bei 542 nm ( $\beta$ -Peak) und 577 nm ( $\alpha$ -Peak). Methämoglobin zeigt seine Absorptionsbanden bei 500 nm und 632 nm und die des

Hämichroms liegen bei 537 nm und 565 nm. Mit zunehmendem Blutalter werden die Peaks des Oxyhämoglobins immer kleiner, wohingegen die des Methämoglobins größer werden. Ist das Blut sehr alt, nehmen auch die Absorptionsbanden des Methämoglobins ab. Dafür steigen die des Hämichroms. Das Verhältnis dieser Peaks zueinander ermöglicht eine ungefähre Altersschätzung des Blutes. [38, 45, 46]

## 3 Methoden

Im folgenden Kapitel wird näher auf die verwendeten Materialien der durchgeführten Experimente eingegangen. Außerdem wird deren Ablauf genauer beschrieben.

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Blut

Menschliche Probenmaterialien, das bedeutet Körperflüssigkeiten, Zellkulturen, Gewebe, usw., sind gemäß des Punktes 4.4.1 Absatz 1 der TRBA 100 „*Schutzmaßnahmen für Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien*“ als potenziell infektiös zu betrachten, sofern deren Infektionsstatus nicht weiter bekannt ist. Aufgrund dessen ist es notwendig, dass die Durchführung entsprechender Tätigkeiten unter den Bedingungen der Schutzstufe 2 (gemäß Nummer 5.3) stattfindet. [47]

Da die spektroskopischen Messungen in Haus 8 im Raum 8-002 der Hochschule Mittweida durchgeführt wurden und dieses Labor nur der Schutzstufe 1 (gemäß Nummer 5.2) entspricht, musste für das Experiment auf das Blut eines anderen Säugetiers zurückgegriffen werden. [47] Dieses sollte dem des Menschen möglichst ähnlich sein, um trotz allem aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Aufgrund der einfachen und schnellen Verfügbarkeit wurde für alle Experimente Schweineblut verwendet. Dieses wurde von der Metzgerei Richter im Kaufland Mittweida zur Verfügung gestellt und direkt im Anschluss an die Abholung ohne den Einsatz eines Gerinnungsmittels weiterverarbeitet.

#### 3.1.2 Trägermaterial

Als Trägermaterial für das Experiment wurde ein weißer Baumwollstoff (100% Baumwolle) der Marke *Yessica* verwendet. Die Auswahl wurde aufgrund der Annahme, dass dieser Stoff den Alterungsprozess der Blutspuren nicht beeinflusst, getroffen. Das Trägermaterial wurde auf 15 Quadrate mit einer Größe von etwa 2 x 2 cm zugeschnitten.

#### 3.1.3 Lösemittel

Um die Blutproben mittels UV/VIS-Spektroskopie hinsichtlich ihrer stofflichen Zusammensetzung zu untersuchen, war es notwendig, diese zuvor in einem geeigneten Lösemittel zu lösen. Dabei galt es zu beachten, dass das Lösemittel in der Lage ist die Probe zu lösen, ohne eine Reaktion mit ihr einzugehen. [43]

Aus diesem Grund wurde destilliertes Wasser der Marke *K-Classic* verwendet. Das ist Leitungs- bzw. Quellwasser, das durch Verdampfen und anschließende Kondensation von den meisten Salzen, Mikroorganismen und organischen Stoffen gereinigt wurde. [48]

Aufgrund des Konzentrationsunterschieds der gelösten Salze und Mineralstoffe innerhalb und außerhalb der Zelle, der beim Lösen der Blutproben in destilliertem Wasser vorliegt, entsteht ein osmotischer Druck in den Blutzellen. Dadurch strömt das Wasser in die roten Blutkörperchen, sodass diese sich ausdehnen und letztendlich zerplatzen. Dieser Prozess, der auch als Hämolyse bekannt ist, sorgt für das Freiwerden des Hämoglobins und ist ein weiterer Grund für die Auswahl dieses Lösemittels. [49]

### 3.1.4 Weitere Materialien

Wie in Nummer 5.2.1 Absatz 11 und Nummer 5.2.2 Absatz 3 TRBA 100 „*Schutzmaßnahmen für Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien*“ vorgeschrieben, wurden für die Experimente ein Laborkittel und Einmal-Untersuchungshandschuhe aus Latex der Firma *ARNOWA* verwendet. [47]

Das Blut wurde mit Einweg-Pasteurpipetten von *Carl Roth GmbH + Co. KG* auf das Trägermaterial pipettiert. Für die spektroskopischen Messungen wurden die Blutproben in einem Becherglas der Firma *JENAer GLAS*, mit einem Fassungsvermögen von 25 ml gelöst und anschließend in *Rotilabo®* - UV-Einmalküvetten von *Carl Roth GmbH + Co. KG* gefüllt.

## 3.2 Geräte

### 3.2.1 Spektrophotometer Shimadzu UV-1800

Alle spektroskopischen Messungen wurden mit dem Spektrophotometer Shimadzu UV-1800 durchgeführt. Dieses Zweistrahl-Spektrophotometer, dessen Funktionsweise bereits in Abschnitt 2.4.2 näher erläutert wurde, ist in der Lage Messungen in einem Wellenlängenbereich von 190 - 1100 nm durchzuführen.

Das Gerät besitzt zwei verschiedene Lichtquellen. Eine Deuterium-Lampe für den ultravioletten Bereich von 190 bis 340,8 nm und eine Wolfram-Jod-Lampe für den sichtbaren bzw. nahen Infrarotbereich 340,8 bis 1100 nm. Der Lampenwechsel bei einer Wellenlänge von 340,8 nm ist standardmäßig eingestellt, kann aber auch manuell verändert



werden. Von dieser Funktion wurde jedoch kein Gebrauch gemacht. Es wurde mit dem automatischen Lichtquellenwechsel bei 340,8 nm gearbeitet.

Um exakte Messwerte zu erhalten, müssen sich die beiden Lampen erst aufheizen. Deshalb sollte das Spektrophotometer mindestens 30 Minuten vor der ersten Messung eingeschaltet werden. Die gemessenen Daten können anschließend direkt an einen Computer übermittelt und mit der Software *UV-Probe* visualisiert und ausgewertet werden. [50]



**Abbildung 8: Spektrophotometer Shimadzu UV-1800**

Die Abbildung zeigt das Spektrophotometer Shimadzu UV-1800, das für die spektroskopische Untersuchung der Blutproben verwendet wurde. [51]

### 3.3 Verwendete Programme

**Tabelle 1: Übersicht der Programme, die für die Durchführung und Auswertung der Experimente verwendet wurden.**

Programm	Nutzung
Notability	Erstellung der Pathways/Abbildungen
UV - Probe	Messwerte der spektroskopisch untersuchten Proben werden direkt an die Software weitergeleitet und visualisiert
Microsoft Excel	Auflistung und Strukturierung der erhobenen Daten sowie deren statistische Auswertung
RStudio	Visualisierung und statistische Auswertung der erhobenen Daten; Programmierung

### 3.4 Umwelteinflüsse

Werden Blutspuren an einem Tatort im Freien gefunden, waren sie vom Zeitpunkt ihrer Entstehung bis zu dem ihrer Auffindung verschiedenen Umweltbedingungen ausgesetzt. Insbesondere die Temperatur, die Luftfeuchtigkeit und die Lichtverhältnisse haben einen Einfluss auf die Blutalterung. Diese Faktoren wurden für die Experimente nicht verändert. Stattdessen alterten alle Blutproben unter annähernd gleichbleibenden Bedingungen.

Bei der Abholung am 31.05.2022 hatte das Schweineblut eine Temperatur von etwa 7°C. Nachdem es auf die Baumwoll-Zuschnitte pipettiert wurde, wurden diese bei nahezu gleichbleibender Temperatur und Luftfeuchte im Raum 8-002 der Hochschule Mittweida gelagert. Zu jeder spektroskopischen Messung wurden auch die Raumtemperatur und die Luftfeuchte dieses Zimmers kontrolliert. Diese sind in Tabelle 2 aufgeführt. Um davon den Durchschnitt zu erhalten, wurden alle gemessenen Werte durch ihre Anzahl geteilt. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Raumtemperatur von 22,5°C und eine durchschnittliche Luftfeuchte von 50,2%.

**Tabelle 2: Temperatur und Luftfeuchte zum Zeitpunkt der spektroskopischen Messungen**

Datum	31.05.	01.06.	02.06.	07.06.	17.06.	22.06.	28.06.	05.07.	12.07.
Temperatur in °C	22,3	21,9	22,5	23,1	22,7	22,3	22,6	23,3	21,9
Luftfeuchte in %	45	47	51	57	48	47	53	49	55

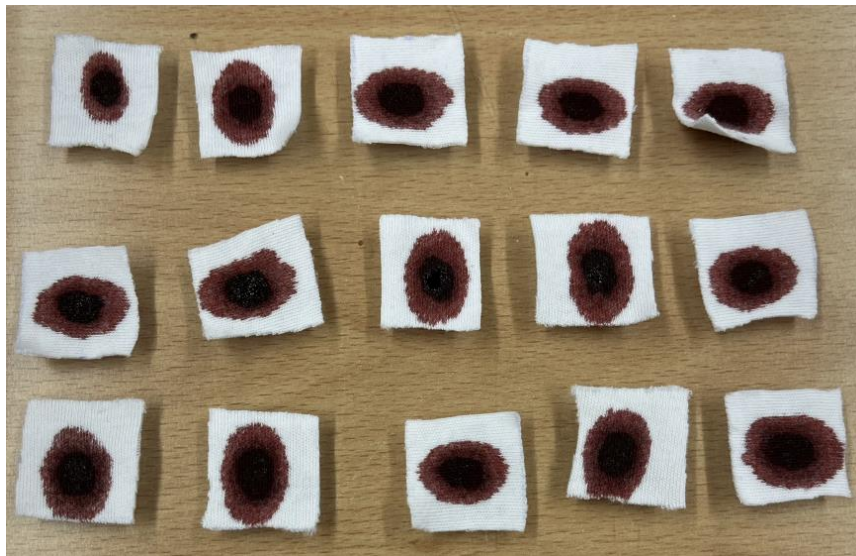
Gemessen wurden diese Werte mit einem batteriebetriebenen Thermometer der Marke *DOQAUS*. Das ist in der Lage, die Temperatur mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  und die Luftfeuchtigkeit mit einer Genauigkeit von  $\pm 3\%$  zu messen. [52]

## 3.5 Methoden

### 3.5.1 Vorbereitung

Um die Untersuchungen der kommenden Wochen vorzubereiten, wurde zunächst eine Glasplatte, die als Unterlage für die Blutproben dienen sollte, mit heißem Wasser und Seife gereinigt. Danach wurde sie mit einem Küchentuch abgetrocknet und die zuvor vorbereiteten Baumwoll-Zuschnitte wurden darauf verteilt.

Im Anschluss daran wurde das Schweineblut von der Metzgerei Richter abgeholt und in einer Plastiktüte zur Hochschule transportiert. Dort wurde es in ein Becherglas der Firma *Rasotherm*, mit einem Fassungsvermögen von 250 ml, umgefüllt. Mit Einweg-Pasteurpipetten wurde dann jeweils ein Tropfen Blut, das entspricht in etwa 50  $\mu\text{l}$ , auf dem Trägermaterial verteilt. Da für die Experimente kein Gerinnungsmittel verwendet wurde, musste diese Vorbereitung möglichst schnell erfolgen, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Das übrig gebliebene Blut wurde im Waschbecken entsorgt.



**Abbildung 9: Vorbereitete Blutproben**

Auf dieser Abbildung sind die 15 Blutproben, die für die mikroskopischen und spektroskopischen Untersuchungen verwendet wurden, zu sehen. Sie befinden sich auf einer Glasplatte.

### 3.5.2 Spektroskopische Messungen

Mit Hilfe der gemessenen Absorption des Lichts, die vor allem durch organische Moleküle entsteht, ist es möglich eine quantitative Analyse der stofflichen Zusammensetzung durchzuführen. [53]

Um eine Blutprobe spektroskopisch zu messen, wurde sie zunächst für 60 Minuten in 15 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde das Becherglas, in dem sich die gelöste Probe befand, kurz geschwenkt. Danach wurde das Baumwollstück entfernt. Etwa 3,5 ml der Lösung wurden mittels Einweg-Pasteurpipette in eine UV-Einmalküvette gefüllt. Diese Menge sollte möglichst eingehalten werden, um eine fehlerfreie Messung zu gewährleisten. Deutlich weniger der Lösung hätte zur Folge, dass ein Teil des Lichts an der Probe vorbei geht. Daraus würden wiederum Messungenauigkeiten resultieren. Um solche Fehler zu umgehen, ist es ebenfalls notwendig, Luftblasen in der Küvette zu vermeiden. Des Weiteren sollte die Küvette ausschließlich am oberen Drittel der matten Seiten angefasst werden, um keine Fingerabdrücke zu hinterlassen. Auch diese könnten zu ungenauen Messergebnissen führen. [43]

Weitere Messfehler können entstehen, wenn die Lampen des Spektrophotometers sich nicht ausreichend aufheizen konnten. Deshalb sollte das Gerät mindestens 30 Minuten vor der ersten Messung eingeschaltet werden. Nach dieser Zeit wurde eine UV-

Einmalküvette mit destilliertem Wasser in den Probenraum des Spektrophotometers gesteckt. Auf einer Seite der Küvette befindet sich am oberen Rand ein nach unten zeigender Pfeil. Sobald sich die Küvette im Probenraum befindet, sollte sich dieser Pfeil auf der rechten Seite befinden. Nach der korrekten Positionierung der Küvette wurde das Spektrophotometer geschlossen und mit dem Computer verbunden. Mit Hilfe des Programms UV-Probe wurden anschließend folgende Parameter für die Messmethode eingestellt:

- Messbereich: 200 nm - 650 nm
- Intervall: 1,0
- Mode: Absorbance
- Geschwindigkeit: Medium

Danach erfolgte die erste Messung - die Referenzmessung mit destilliertem Wasser. Das Computerprogramm speichert diese Messung automatisch als Baseline. Somit kann die Eigenabsorption des Lösemittels ausgeschlossen werden. Anschließend wurde die Küvette mit dem Lösemittel durch die Küvette mit der gelösten Blutprobe ausgetauscht. Diese wurde dann mit derselben Messmethode gemessen. Zum Schluss konnten die gemessenen Werte am Computer angezeigt werden.

Insgesamt erfolgten 9 Messungen über einen Zeitraum von 6 Wochen. In der folgenden Tabelle sind die Zeitpunkte, zu denen diese stattfanden, aufgeführt.

**Tabelle 3: Datum und Uhrzeit der spektroskopischen Messungen sowie die gesamte Liegedauer in Stunden**

Messung	Datum/Uhrzeit	X Stunden nach Präparation
1	31.05.2022/14:15	0
2	01.06.2022/14:15	24
3	02.06.2022/18:15	52
4	07.06.2022/13:15	167
5	17.06.2022/11:45	405,5
6	22.06.2022/14:15	528
7	28.06.2022/12:15	670
8	05.07.2022/11:45	837,5
9	12.07.2022/11:45	1005,5

### 3.5.3 Statistische Auswertung der Daten

Alle Messwerte wurden zur Auswertung aus *UV-Probe* in eine Excel-Tabelle exportiert. Zur weiteren Verarbeitung, Analyse und Visualisierung der Daten wurde die Programmiersprache R mit der grafischen Benutzeroberfläche *RStudio* verwendet. Mit einem R-Skript wurden die Messwerte zunächst normiert, um die stofflichen Veränderungen des Blutes im Laufe der Zeit besser darstellen zu können.

Anschließend wurden die gemessenen Werte grafisch dargestellt. Zur besseren Orientierung wurden alle Messungen durch unterschiedliche Farben abgebildet. Außerdem wurde der Wellenlängenbereich auf 250 nm bis 650 nm zugeschnitten, da das Hauptaugenmerk auf den Hämoglobinderivaten liegt, deren charakteristische Peaks sich in diesem Teil befinden.

Der Quellcode ist in Anlage A1 zu finden.

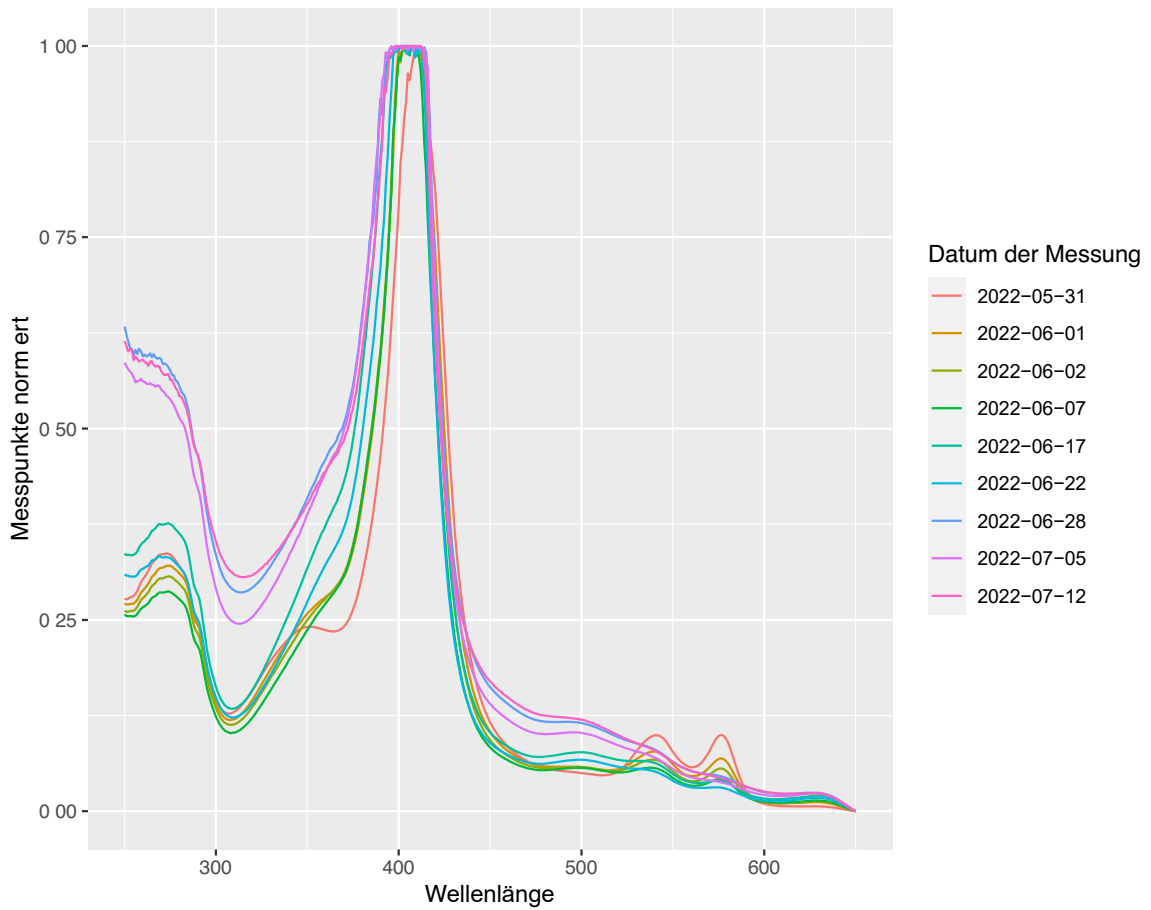
## 4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der spektroskopischen Messungen vorgestellt. Die Versuchsreihe startete am 31.05.2022 und endete am 12.07.2022. In diesem Zeitraum wurden insgesamt 9 Messungen durchgeführt.

Wie bereits im Abschnitt 3.5.3 erwähnt, wurden alle aufgezeichneten Daten mit Hilfe von *RStudio* visualisiert und verschiedenfarbig dargestellt. Eine Übersicht der gesamten normierten Spektren ist in Abbildung 10 zu sehen. Daran lassen sich die Unterschiede der Spektren zueinander und damit die Veränderung des Blutes in Abhängigkeit von der Zeit sehr gut erkennen.

Während einige Peaks kleiner werden oder zum Teil sogar verschwinden, steigen andere über die Zeit an. Im Folgenden sind außerdem Tabellen zu finden, die diese Eigenschaft verdeutlichen, da die Position und Größe der Peaks im Blutspektrum nicht besonders gut zu erkennen sind.

Im Gegensatz dazu ist die Linksverschiebung der Soret-Bande, die bei zunehmendem Alter des Blutes auftritt, in dieser Abbildung sehr gut sichtbar. Da es hier zu einer Überlagerung der Spektren kommt, sind diese in den Abbildungen 11-19 nochmal einzeln dargestellt. Darauf sind die charakteristischen Peaks besser zu erkennen.



**Abbildung 10: Normierte Spektren aller Messpunkte**

Die Tabellen 4-6 zeigen die Peaks verschiedener Hämoglobinderivate und Globin. Darin aufgeführt sind die Wellenlängen der Peak-Standorte, die dazugehörigen Messwerte (vor der Normierung) sowie die Anmerkung „sinkt“ oder „steigt“. In diesem Zusammenhang bedeutet „sinkt“, dass ein Messwert, im Vergleich zum Vorherigen, gesunken ist. „Steigt“ weist darauf hin, dass der Messwert größer ist als der Vorherige.



Tabelle 4: Peak-Standorte von Oxyhämoglobin und Hämichrom

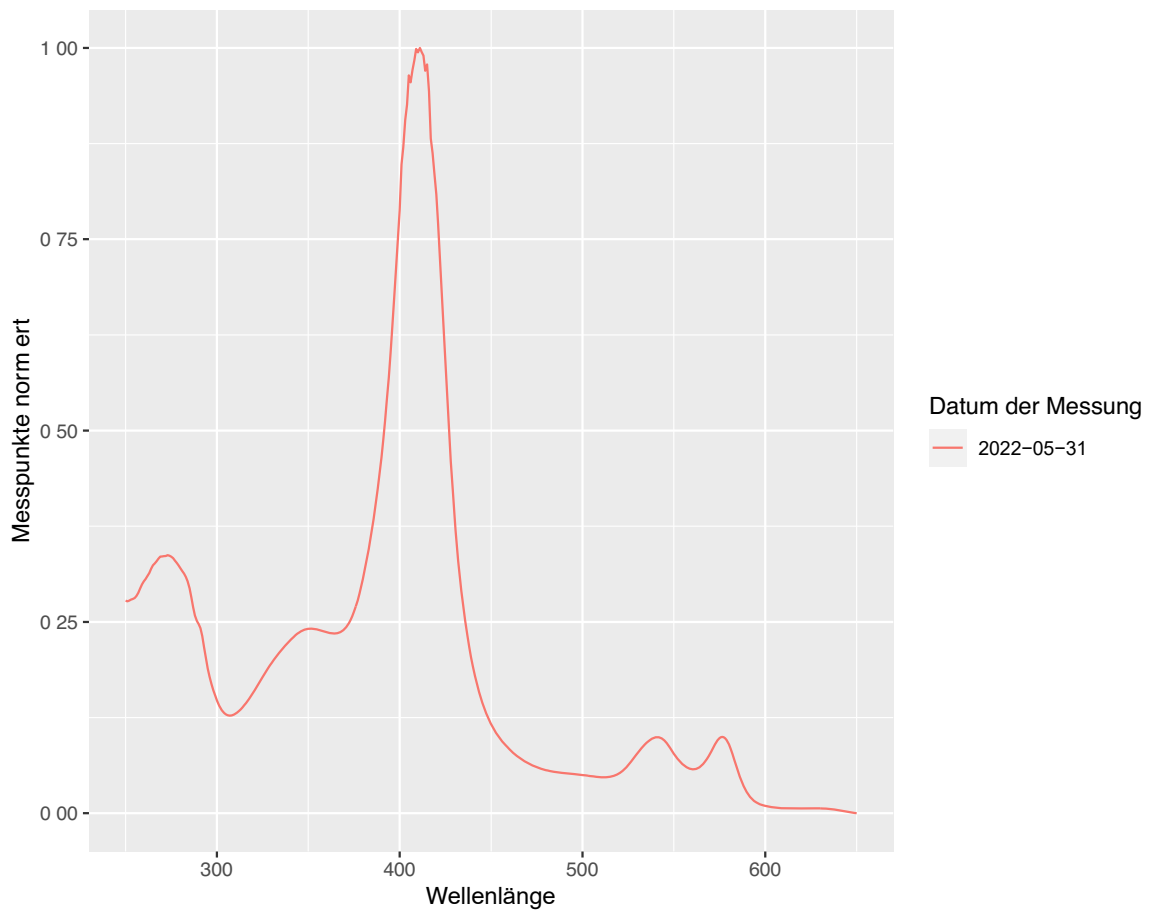
	HbO <sub>2</sub> ~ 542 nm / HC ~ 537			HbO <sub>2</sub> ~ 577 nm / HC ~ 565		
	WL	Messpunkte	Bemerkung	WL	Messpunkte	Bemerkung
M1	541	0,415		576	0,416	
M2	540	0,353	sinkt	576	0,317	sinkt
M3	539	0,319	sinkt	576	0,274	sinkt
M4	538	0,288	sinkt	576	0,231	sinkt
M5	532	0,340	steigt	575	0,240	sinkt
M6	535	0,304	sinkt	574	0,213	sinkt
M7	535	0,621	steigt	565	0,489	steigt
M8	535	0,498	sinkt	565	0,373	sinkt
M9	535	0,696	steigt	565	0,570	steigt

Tabelle 5: Peak-Standorte Methämoglobin

	MetHb ~ 500 nm			MetHb ~ 632 nm		
	WL	Messpunkte	Bemerkung	WL	Messpunkte	Bemerkung
M1	500	0,221		627	0,051	
M2	500	0,273	steigt	627	0,091	steigt
M3	498	0,282	steigt	628	0,105	steigt
M4	498	0,288	steigt	627	0,120	steigt
M5	499	0,385	steigt	628	0,162	steigt
M6	499	0,354	sinkt	629	0,159	sinkt
M7	492	0,737	steigt	627	0,394	steigt
M8	496	0,604	sinkt	627	0,303	sinkt
M9	500	0,823	steigt	625	0,476	steigt

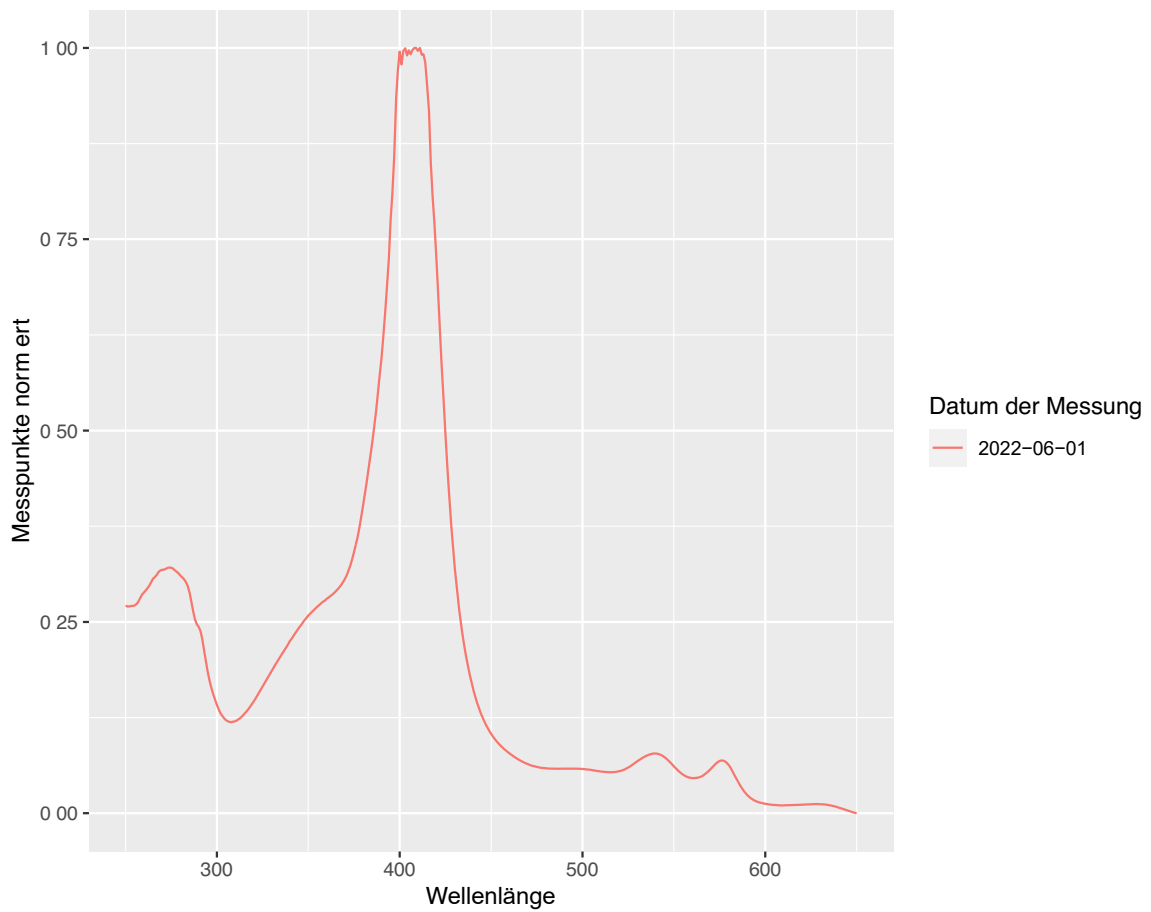
Tabelle 6: Peak-Standort Globin

Globin ~ 275 nm			
	WL	Messpunkte	Bemerkung
M1	273	1,345	
M2	274	1,314	sinkt
M3	274	1,262	sinkt
M4	274	1,194	sinkt
M5	274	1,557	steigt
M6	269	1,393	sinkt
M7	269	2,494	steigt
M8	268	2,321	sinkt
M9	268	2,491	steigt



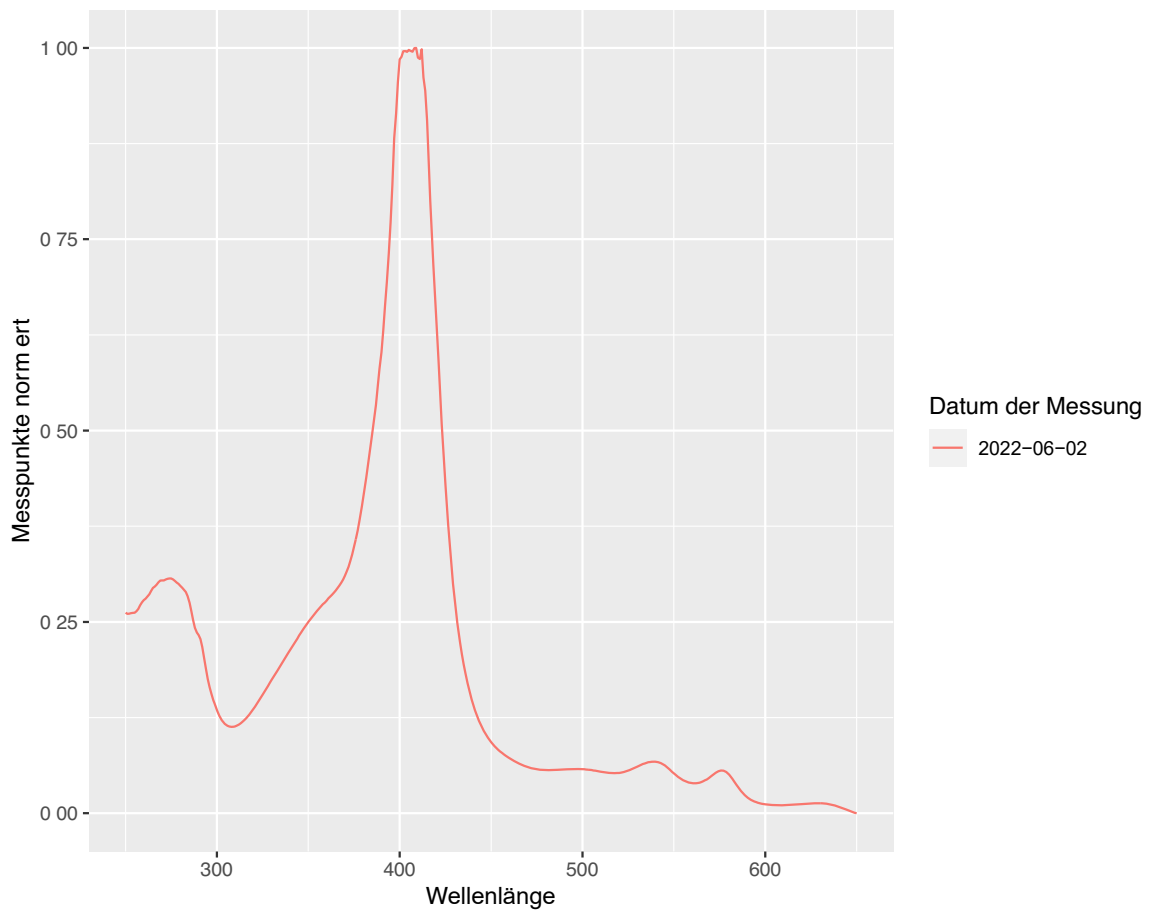
**Abbildung 11: Normiertes Spektrum vom 31.05.2022**

Das Blutspektrum vom 31.05.2022 zeigt sechs Peaks. Diese liegen bei 273 nm, 352 nm, 411 nm, 541 nm, 576 nm und 627 nm.



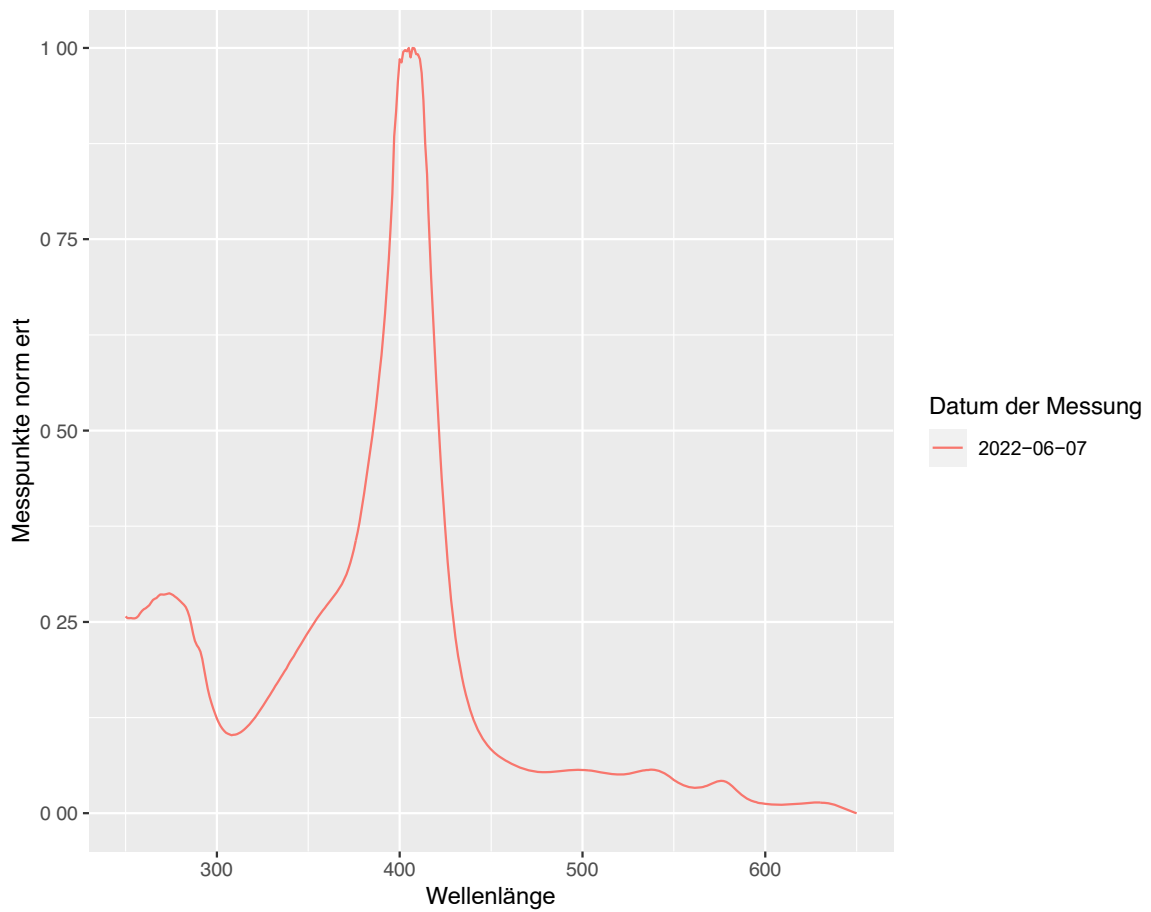
**Abbildung 12: Normiertes Spektrum vom 01.06.2022**

Die Peaks der Messung vom 01.06.2022 befinden sich bei 274 nm, 409 nm, 494 nm, 540 nm, 576 nm und 627 nm.



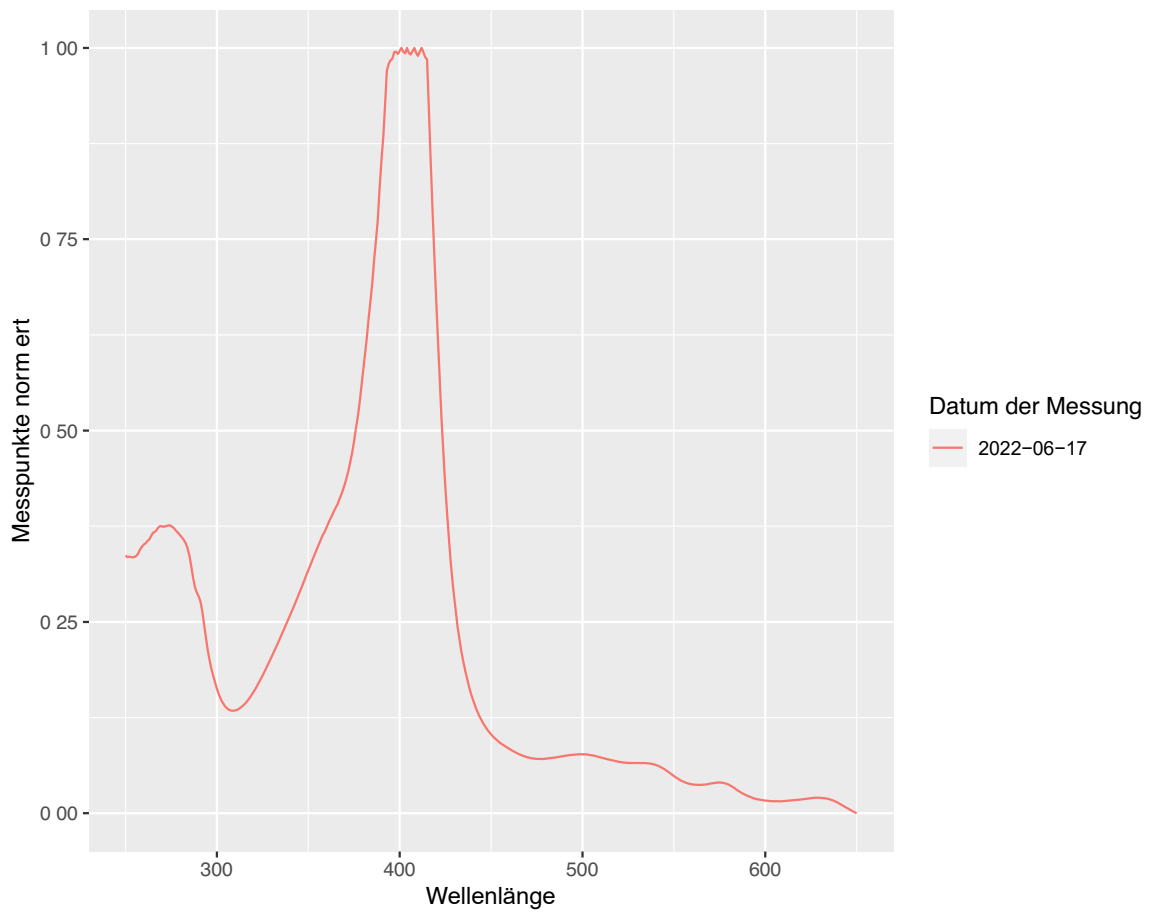
**Abbildung 13: Normiertes Spektrum vom 02.06.2022**

Am 02.06.2022 lagen die sechs Peaks bei 274 nm, 409 nm, 498 nm, 539 nm, 576 nm und 628 nm.



**Abbildung 14: Normiertes Spektrum vom 07.06.2022**

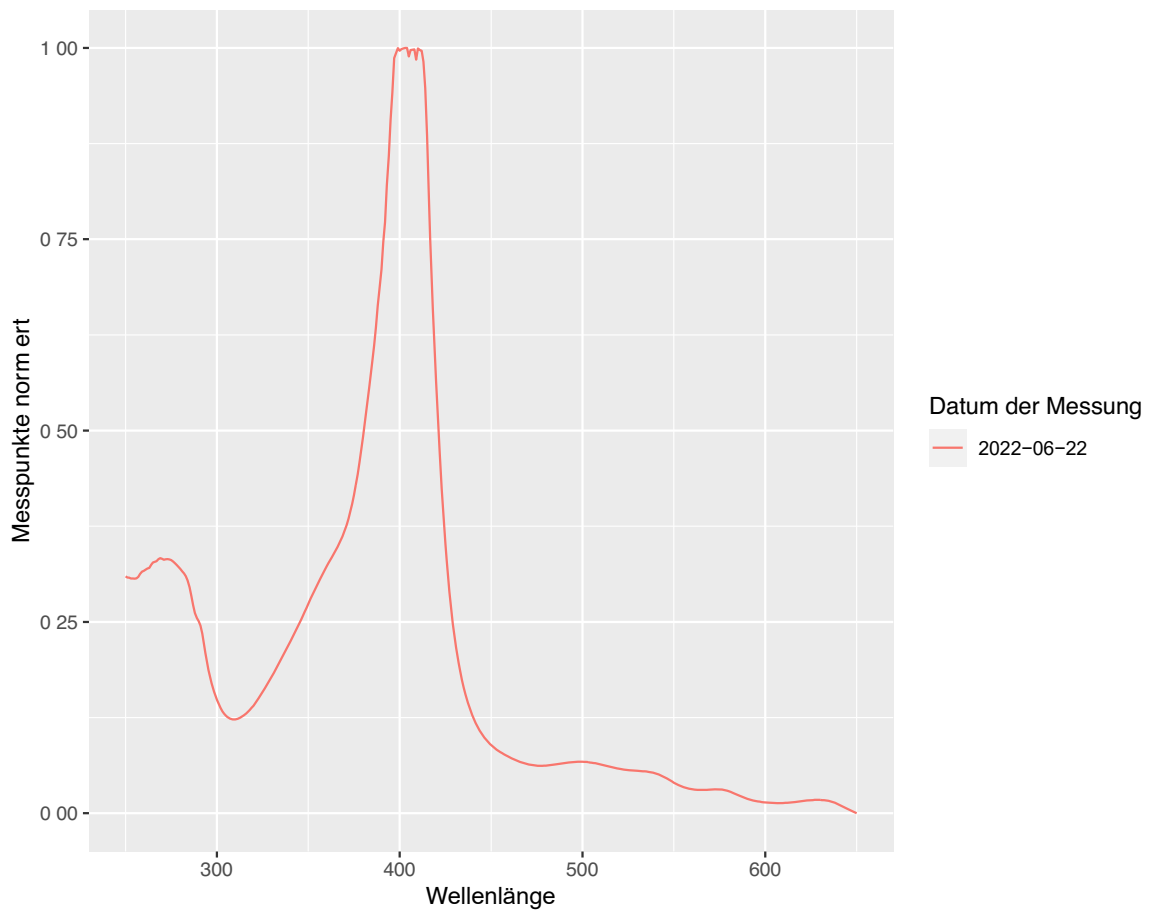
Die Banden des Blutspektrums vom 07.06.2022 erreichen bei 274 nm, 405 nm, 498 nm, 538 nm, 576 nm und 627 nm ein Maximum.



**Abbildung 15: Normiertes Spektrum vom 17.06.2022**

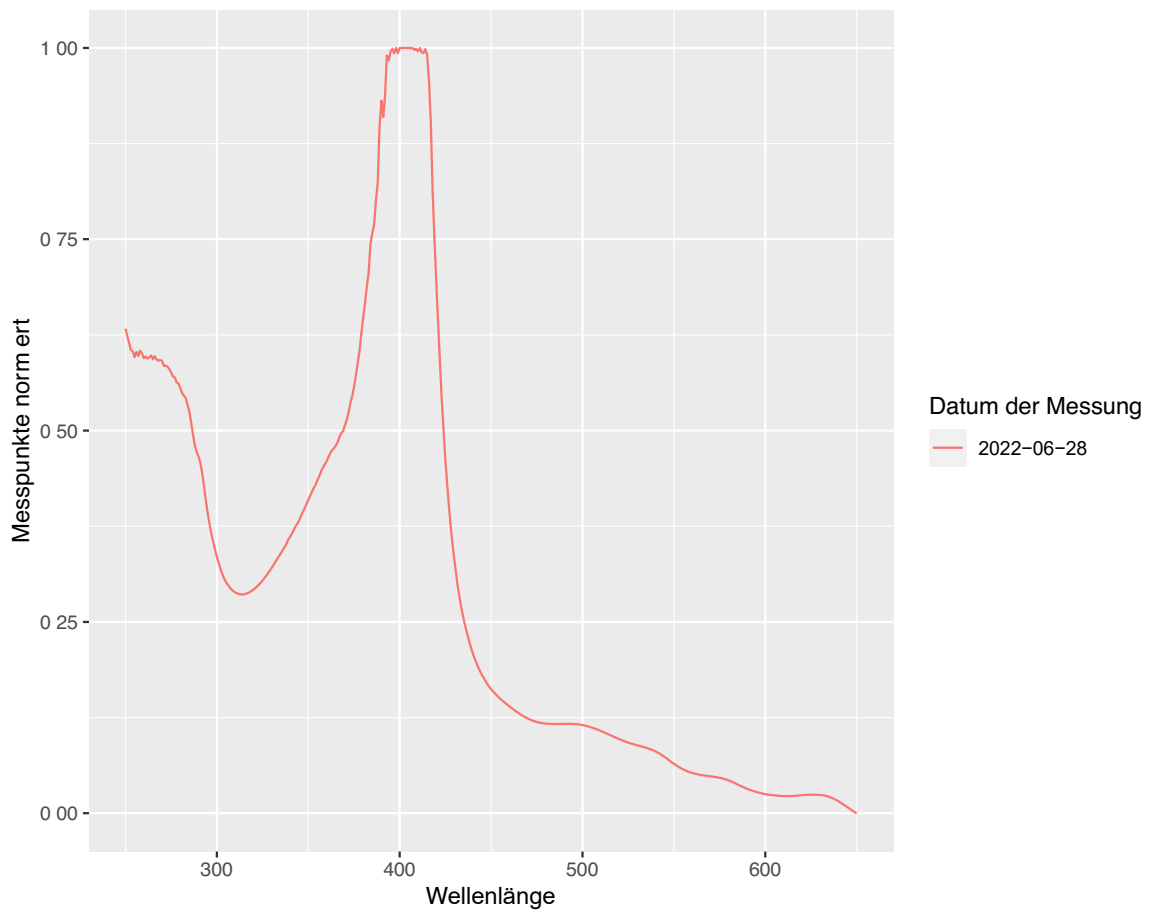
Bei der darauffolgenden Messung am 17.06.2022 zeigen sich die Peaks bei 274 nm, 408 nm, 499 nm, 532 nm, 575 nm und 628 nm.





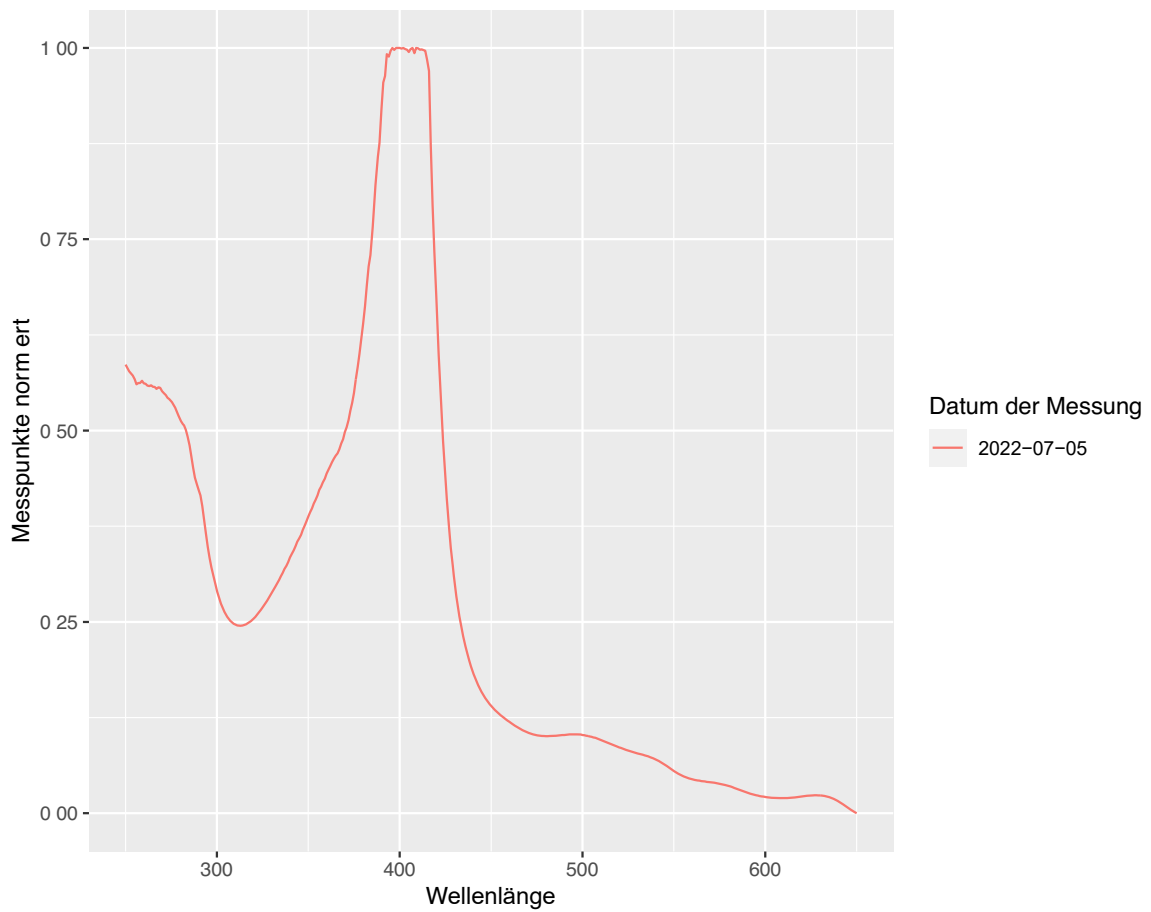
**Abbildung 16: Normiertes Spektrum vom 22.06.2022**

Das Blutspektrum, das am 22.06.2022 aufgenommen wurde, besitzt nur noch fünf Peaks. Diese liegen bei 269, 404 nm, 499 nm, 574 nm und 629 nm.



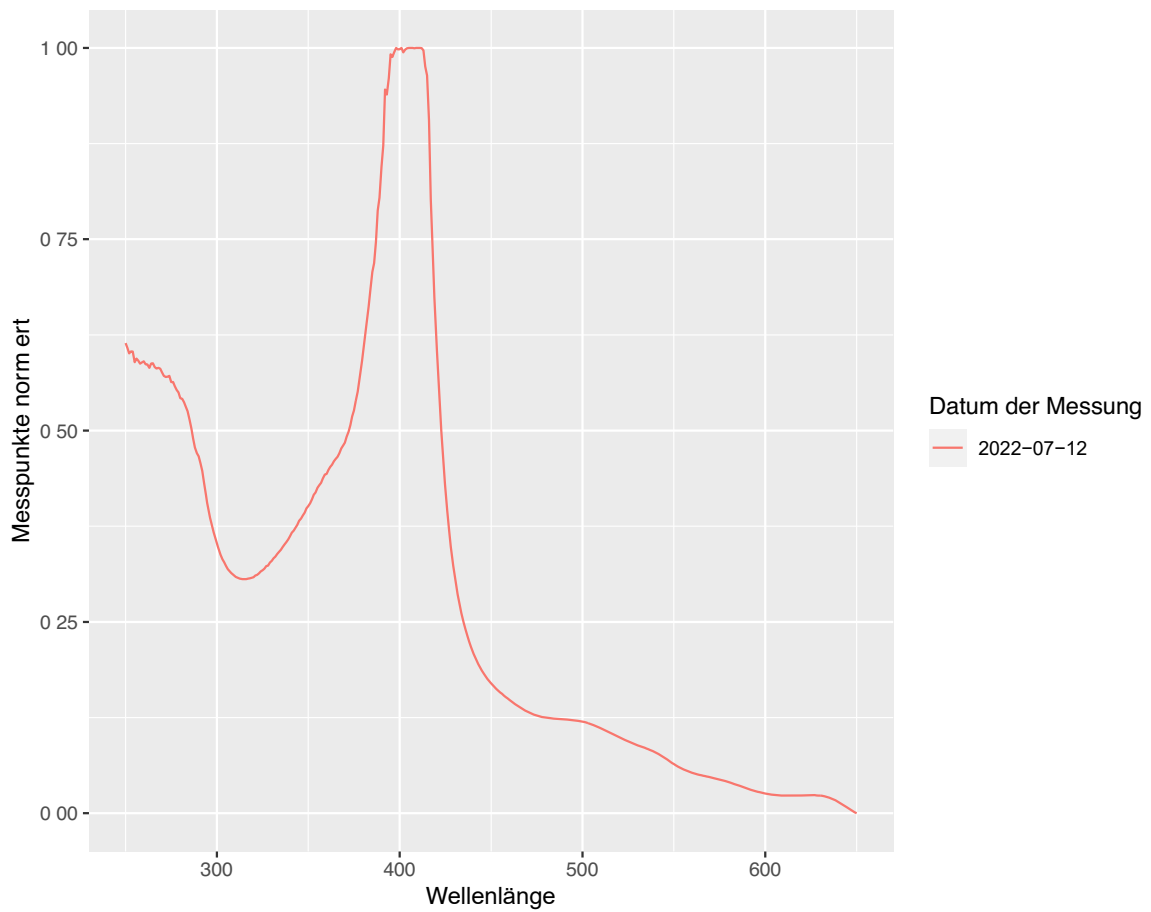
**Abbildung 17: Normiertes Spektrum vom 28.06.2022**

Die folgenden zwei Messungen zeigen nur noch vier Hochpunkte im Spektrum. Am 28.06.2022 sind diese bei 269 nm, 404 nm, 492 nm und 627 nm zu erkennen.



**Abbildung 18: Normiertes Spektrum vom 05.07.2022**

Die Peaks der Messung vom 05.07.2022 liegen bei 268 nm, 400 nm, 495 nm und 627 nm.



**Abbildung 19: Normiertes Spektrum vom 12.07.2022**

Bei der letzten Messung erreichen nur noch drei Banden des Blutspektrums bei 268 nm, 409 und 625 nm ein Maximum.



## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Bachelorarbeit war es herauszufinden, ob sich Hämichrom nach einem längeren Zeitraum weiter zersetzt oder ob während des Blutabbaus weitere Hämoglobinderivate oder andere Stoffe entstehen. Dafür wurden Blutproben aus Schweineblut angesetzt und für sechs Wochen bei gleichbleibenden Umweltbedingungen im Labor der Hochschule Mittweida gelagert. Um die Zusammensetzung des Blutes zu analysieren, wurden es spektroskopisch untersucht. Dafür wurden die Proben für jeweils 60 Minuten in destilliertem Wasser aufgelöst. Anhand der erhobenen Daten soll festgestellt werden, wie sich das alternde Blut über den Zeitraum verändert.

In diesem Kapitel werden die zuvor aufgeführten Ergebnisse ausgewertet.

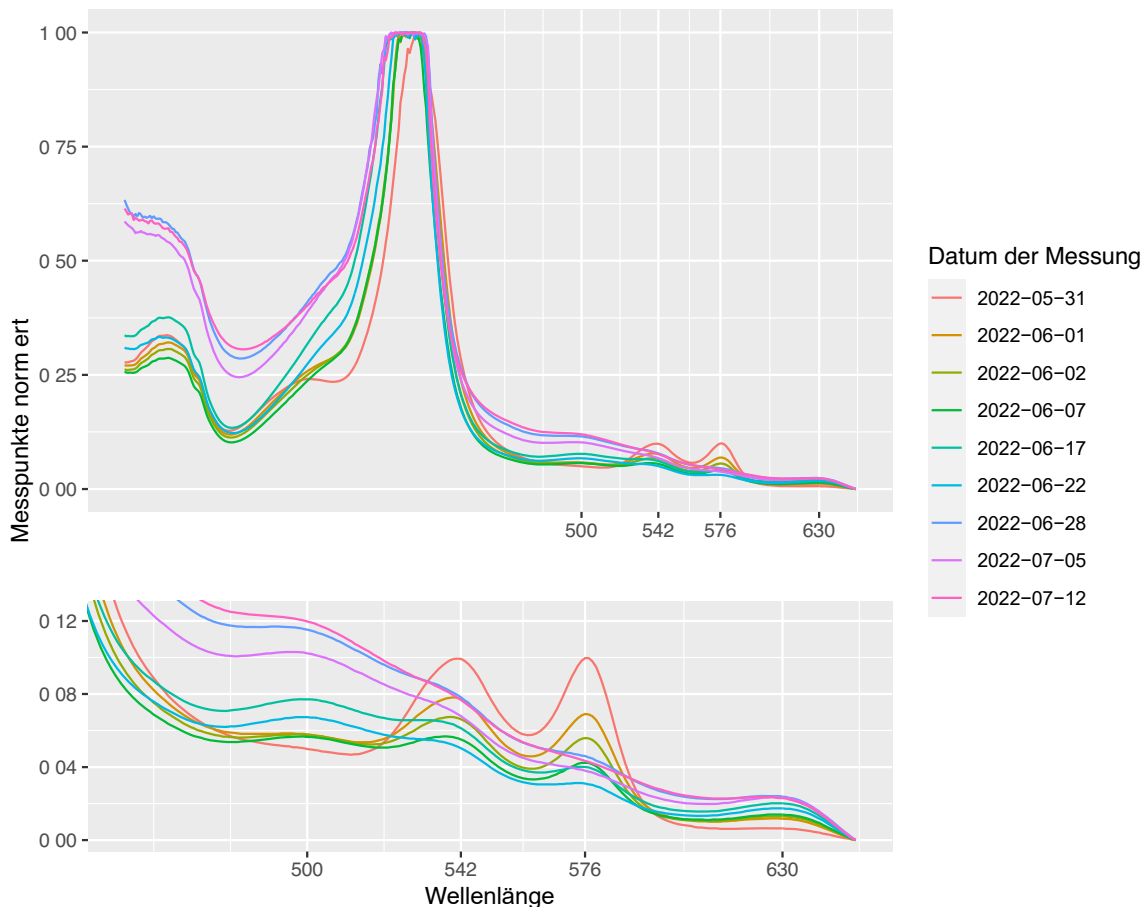
Werden die Spektren in Abbildung 10 genauer betrachtet, ist zu erkennen, dass der Peak bei  $\sim 275$  nm bis zu einem Blutalter von etwa drei Wochen kontinuierlich sinkt, in der darauffolgenden Woche jedoch rasant ansteigt. Fünf Wochen nach Start des Experiments fällt der Messwert an dieser Stelle wieder etwas ab, bevor er in der sechsten Woche nochmals ansteigt. Vermutlich äußert sich Globin durch einen Peak an diesem Punkt. [54]

Bei etwa 365 nm ist zum Zeitpunkt der ersten Messung ein Minimum des Graphen zu erkennen. Mit zunehmendem Alter des Blutes wird dieser Tiefpunkt jedoch immer weniger sichtbar. Der Messwert an dieser Stelle wird in den ersten Tagen kontinuierlich größer, sinkt aber dann bei jeder zweiten Messung wieder ein kleines Stück. Der Trend an diesem Punkt ist dennoch steigend. Zurückzuführen ist diese Veränderung vermutlich auf Hämichrom. da die Konzentration dieses Stoffes zunimmt, je älter das Blut wird. [45]

Auch die beiden Peaks des Methämoglobins steigen über den Versuchszeitraum an. Der erste Hochpunkt bei etwa 500 nm ist erst ab der zweiten Messung vorhanden und steigt in den ersten Wochen. Dieser Anstieg verläuft nicht gleichmäßig. Zu Beginn wird dieser Peak nur langsam, mit zunehmendem Alter des Blutes aber immer schneller größer (siehe Abbildung 20). Grund dafür ist, dass das Hämoglobin zunächst einmal zu Oxyhämoglobin oxygenieren muss, bevor daraus Methämoglobin entstehen kann. Zum Zeitpunkt der sechsten Messung, drei Wochen nach Start der Versuchsreihe, ist ein leichter Rückgang des Peaks zu erkennen. Die Ursache dafür könnte die zunehmende Umsetzung von Hämichrom aus Methämoglobin sein. Normalerweise wäre an dieser Stelle zu erwarten, dass die Methämoglobinpeaks allmählich wieder sinken. [23] Das ist jedoch nicht der Fall. Stattdessen steigen sie weiter an. Ein ähnliches Verhalten lässt sich bei  $\sim 630$  nm beobachten, auch wenn der Anstieg des Peaks an dieser Stelle nicht ganz so stark ist. Es ist unwahrscheinlich, dass Methämoglobin für diesen Anstieg nach so langer Zeit verantwortlich ist, da dieses Hämoglobinderivat bereits in Hämichrom umgewandelt

sein sollte. Vermutlich wird dieser Anstieg durch einen anderen Stoff verursacht, der sich durch Peaks bei  $\sim 500$  nm und  $630$  nm äußert.

Die beiden Oxyhämoglobinpeaks werden wie vermutet in den ersten drei Wochen nach Start der Versuchsreihe kleiner, da  $\text{HbO}_2$  zu  $\text{MetHb}$  autooxidiert. Die Aussage von *Kind et al.*, dass die Konzentration von Oxyhämoglobin mit der Zunahme des Blutalters abnimmt, kann bestätigt werden. [23] Dieser Rückgang ist jedoch nicht stetig und zu Beginn stärker als nach mehreren Wochen. Die Behauptung von *Bremmer et al.*, dass die Oxidation von Oxyhämoglobin zu Beginn schnell abläuft, die Geschwindigkeit aber bereits nach einigen Stunden abnimmt, kann somit ebenfalls bestätigt werden. Die Abstände der Messwerte zueinander werden in den ersten Wochen mit der Zeit immer kleiner (siehe Tabelle 4). [40] Auch die These von *Mansouri und Winterhalter*, dass die Globinketten unterschiedliche Oxidationsgeschwindigkeiten haben und die Autooxidation der  $\alpha$ -Ketten schneller abläuft als die der  $\beta$ -Ketten, kann bestätigt werden. Der  $\alpha$ -Peak bei  $576$  nm ist zu Beginn größer als der  $\beta$ -Peak bei  $542$  nm. Dieses Verhältnis ändert sich jedoch schon nach einem Tag. Ab der zweiten Messung ist der Peak der  $\beta$ -Ketten ist größer. [28] Die Werte der letzten drei Messungen, vier, fünf und sechs Wochen nach Präparation der Blutproben, steigen wieder an, wobei die Peaks an sich nicht mehr so stark ausgeprägt sind (siehe Abbildung 20). Grund für diese Beobachtung könnte die Überlagerung des Oxyhämoglobins von Hämichrom sein. Zu Beginn der Messreihe nimmt das  $\text{HbO}_2$  schnell ab. Nach einigen Tagen entsteht Hämichrom, was zunächst zu einem langsameren Rückgang und letztendlich sogar zu einem erneuten Anstieg der Peaks führt. Dabei fällt auf, dass die Messwerte bei etwa  $542$  nm stärker ansteigen als bei  $\sim 576$  nm.



**Abbildung 20: Normierte Spektren aller Messpunkte mit Zoom auf 400 nm - 630 nm**

Die Veränderung des Blutes bzw. der Blutspektren bis zu einem Alter von 3 Wochen ist bereits bekannt. Mit zunehmendem Alter sinkt der Anteil an Oxyhämoglobin im Blut. Es findet eine Autooxidation statt und aus dem Oxyhämoglobin entsteht Methämoglobin, dessen Anteil zunächst zunimmt. In einigen studentischen Arbeiten wurde ein Anstieg der Methämoglobinpeaks bei etwa 500 nm und 630 nm und ein Rückgang der Oxyhämoglobinpeaks bei ungefähr 540 nm und 577 nm nachgewiesen. Diese Entwicklungen können mit dieser Arbeit bestätigt werden. [55, 56]

Eine Auffälligkeit bildet das Spektrum der drei Wochen alten Blutprobe vom 22.06.2022. Während die Peaks bei 500 nm, 540 nm und 630 nm eine Woche zuvor bereits wieder ansteigen, sacken die Werte dort zum Zeitpunkt der sechsten Messung nochmal ab. Es wird angenommen, dass dieser Einbruch auf die gesamte Umsetzung von Oxyhämoglobin und Methämoglobin zu Hämichrom zurückzuführen ist. Jenny Möhler machte im Experiment für ihre Masterarbeit die gleiche Beobachtung. [55]

Eine weitere neue Erkenntnis ergibt sich aus den Peaks des Oxyhämoglobins. Während diese Hochpunkte in anderen studentischen Arbeiten, in denen Blutproben nur für etwa drei Wochen beobachtet wurden, ausschließlich kleiner werden, lässt sich hier bei noch



älterem Blut ein erneuter Anstieg der Peaks erkennen. Vermutlich ist Hämichrom für dieses Wachstum verantwortlich.

## 5.1 Fazit

Abschließend lassen sich die neuen Erkenntnisse mit folgenden Aussagen zusammenfassen:

Der Peak bei etwa 275 nm steigt ab einem Blutalter von vier Wochen rasant an. Vermutlich äußert sich dadurch der Globinanteil. [54]

Es ist davon auszugehen, dass die Konzentration von Hämichrom im Blut auch nach sechs Wochen noch zunimmt. Grund für diese Annahme sind die steigenden Messwerte, bei 365 nm, 540 nm und 570 nm. An diesen Stellen äußern sich die Peaks von Hämichrom [45, 46].

Die Hochpunkte bei 500 nm und 630 nm, die charakteristisch für Methämoglobin sind, nehmen auch nach einem Zeitraum von sechs Wochen noch zu. Die These von *Kind et al.*, dass diese mit der Zunahme des Blutalters sinken würden, kann demzufolge nicht bestätigt werden. [23]

## 5.2 Fehlerquellen

Um mögliche Mess- und Konzentrationsfehler zu minimieren, könnten für zukünftige Arbeiten mehrere Blutproben pro Messung verwendet werden. Mit dem daraus resultierenden größeren Datensatz wäre es möglich, die Ergebnisse zu überprüfen.

Da nicht genau bekannt ist, wie alt das verwendete Schweineblut bei der Abholung bereits war, lässt sich das genaue Blutalter zum Zeitpunkt der Messungen nur grob schätzen.

## 6 **Ausblick**

In dieser Arbeit wurde lediglich die Zusammensetzung des Blutes über einen Zeitraum von sechs Wochen betrachtet. Auch die Umweltbedingungen wie Luftfeuchte, Temperatur, Licht, etc. wurden nicht berücksichtigt. In zukünftigen Arbeiten könnten diese Lücken gefüllt werden, indem Blut über einen noch längeren Zeitraum und unter verschiedenen Umweltbedingungen untersucht wird.

Aufgrund der rechtlichen Bestimmungen und des zeitlich begrenzten Rahmens war es außerdem nicht möglich, mit menschlichem Blut zu arbeiten. Für künftige Experimente könnte das geändert werden. In diesem Zuge wäre es auch möglich, Blut von verschiedenen Probanden zu untersuchen. Somit könnte festgestellt werden, ob zum Beispiel das Alter, das Geschlecht oder die Einnahme von Medikamenten einen Einfluss auf die Zusammensetzung und das Alter des Blutes haben.

Des Weiteren könnte untersucht werden, welcher Stoff für einen erneuten Anstieg bei einer Wellenlänge von  $\sim 500$  nm und 630 nm verantwortlich ist.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich auch nach 21 Tagen noch etwas an der Zusammensetzung des Blutes ändert. Es kann demzufolge sinnvoll sein, Blut auch über einen längeren Zeitraum spektroskopisch zu untersuchen, um eine geeignete Methode zur Blutaltersbestimmung finden.

## Literaturverzeichnis

- [1] <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/forensik-53390>, verfügbar am 06.06.2022
- [2] M. Grassberger, H. Schmid, Todesermittlung. Befundaufnahme und Spurensicherung, Springer-Verlag Wien (2009).
- [3] R. H. Bremmer, K. G. de Bruin, M. J. van Gemert, T. G. van Leeuwen, M. C. Aalders, Forensic quest for age determination of bloodstains, *Forensic Science International* 216 (1) (2012) 1–11.
- [4] J. Andrasko, The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis, *Journal of Forensic Science*, 42 (4) (1997) 601-607.
- [5] W. Jelkmann, Blut. In: R.F. Schmidt, F. Lang, M. Heckmann, *Physiologie des Menschen*, 31. Aufl., Springer-Verlag Berlin (2011).
- [6] [https://de.wikipedia.org/wiki/Blut#/media/Datei:Red\\_White\\_Blood\\_cells.jpg](https://de.wikipedia.org/wiki/Blut#/media/Datei:Red_White_Blood_cells.jpg), verfügbar am 07.06.2022
- [7] G. Müller-Newen, P. Petrides, Kapitel 68. Blut – Hämatopoese und Erythrocyten. In: P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch, Springer-Verlag Berlin (2014) 863-876.
- [8] G. Müller-Newen, P. Petrides, Kapitel 69. Blut – Thrombocyten und Leukocyten. In: P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch, Springer-Verlag Berlin (2014) 877-892.
- [9] F. Van den Berg, *Angewandte Physiologie 2. Organsysteme verstehen und beeinflussen*, Georg Thieme Verlag (2005).
- [10] W. Clauss, C. Clauss, Kapitel 9. Funktion von Blut und Immunsystem. In: *Humanbiologie kompakt*, Springer-Verlag Berlin (2018) 221-242.
- [11] G. Zadora, A. Menzyk, In the pursuit of the holy grail of forensic science – Spectroscopic studies on the estimation of time since deposition of bloodstains, *Trends in Analytical Chemistry* (2018).
- [12] <https://www.rcsb.org/structure/2H35>, verfügbar am 12.06.2022

- 
- [13] W. Jelkmann, Kapitel 34. Atemgastransport. In: Physiologie des Menschen, 32. Aufl. Springer-Verlag Berlin (2019) 741-750.
- [14] [http://www.uniklinikum-saarland.de/fileadmin/UKS/Einrichtungen/Fachrichtungen\\_Theor\\_und\\_Klin\\_Medizin/Biochemie/Lehre\\_SS\\_18/180413\\_-\\_Sauerstofffakteure\\_Haemoglobin\\_\\_Myoglobin.pdf](http://www.uniklinikum-saarland.de/fileadmin/UKS/Einrichtungen/Fachrichtungen_Theor_und_Klin_Medizin/Biochemie/Lehre_SS_18/180413_-_Sauerstofffakteure_Haemoglobin__Myoglobin.pdf), verfügbar am 12.06.2022
- [15] G. Müller-Newen, P. Petrides, Kapitel 67. Blut – Bestandteile und Blutplasma. In: P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Lehrbuch, Springer-Verlag Berlin (2014) 857-862.
- [16] D. Labudde, M. Mohaupt, Tägliche Fallarbeit und der Mensch als Spureenträger. In: Bioinformatik im Handlungsfeld der Forensik. Springer-Verlag Berlin (2018) 1-8.
- [17] O. Peschel, F. Ramsthaler, M. Rothschild, Terminologie in der Blutspurenmuster-Analytik. In: Forensische Blutspurenmusteranalyse, Landmanns Media (2015) 31-37.
- [18] O. Leers, Die forensische Blutuntersuchung: ein Leitfaden für Studierende, beamtete und sachverständige Ärzte und für Kriminalisten, Springer-Verlag Berlin (1910).
- [19] W. Schwarzacher, Determination of the age of bloodstains, American Journal of Police Science (1930) 374–380.
- [20] J. Rauschke, Beiträge zur Frage der Alterbestimmung von Blutspuren, Int. J. Legal Med. 40 (1951) 578–584.
- [21] D. Patterson, Use of reflectance measurements in assessing the colour changes of ageing bloodstains, Nature 187 (4738) (1960) 688–689.
- [22] E. Kleihauer, G. Stein, G. Schmidt, Beitrag zur Altersbestimmung von Blutflecken, Arch. Kriminol 140 (1967) 84–94.
- [23] S. Kind, D. Patterson, G. Owen, Estimation of the age of dried blood stains by a spectrophotometric method, Forensic Science 1 (1) (1972) 27–54.
- [24] H. Inoue, F. Takabe, M. Iwasa, Y. Maeno, Y. Seko, A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography, Forensic Sci. Int. 57 (1992) 17–27.

- 
- [25] E. K. Hanson, J. Ballantyne, A blue spectral shift of the hemoglobin Soret band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains, *PLoS One* 5 (9) (2010) e12830.
- [26] U. Köhler, I. Oepen, On the suitability of spectrophotometric analysis for the estimation of blood stain age, *Z Rechtmed.* 79 (3) (1977) 183-7.
- [27] R. H. Bremmer, A. Nadort, T. G. Van Leeuwen, M. J. Van Gemert, M. C. Aalders, Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy, *Forensic Science International* 206 (1) (2011) 166–171.
- [28] T. Matsuoka, T. Taguchi, J. Okuda, Estimation of bloodstain age by rapid determinations of oxyhemoglobin by use of oxygen electrode and total hemoglobin., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 18 (8) (1995) 1031– 1035.
- [29] T. Miki, A. Kai, M. Ikeya, Electron spin resonance of bloodstains and its application to the estimation of time after bleeding, *Forensic Science International* 35 (2-3) (1987) 149–158.
- [30] S. Strasser, A. Zink, G. Kada, P. Hinterdorfer, O. Peschel, W.M. Heckl, et al., Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 8–14.
- [31] S. Anderson, B. Howard, G. R. Hobbs, C. P. Bishop, A method for determining the age of a bloodstain, *Forensic Science International* 148 (1) (2005) 37–45.
- [32] K. Rajamannar, Determination of the age of bloodstains using immunoelectrophoresis, *Journal of Forensic Science* 22 (1) (1977) 159–164.
- [33] A. Tsutsumi, Y. Yamamoto, H. Ishizu, Determination of the age of bloodstains by enzyme activities in blood cells., *The Japanese journal of legal medicine* 37 (6) (1983) 770.
- [34] S. Arany, S. Ohtani, Age estimation of bloodstains: A preliminary report based on aspartic acid racemization rate, *Forensic Science International* 212 (1) (2011) e36–e39.
- [35] K. Ackermann, K.N. Ballantyne, M. Kayser, Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction, *Int. J. Legal Med.* (2010).

- [36] M. Wick et al., Klinik und Labor Eisenstoffwechsel und Anämien, Springer-Verlag Wien (2002) 17-22.
- [37] <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/549519/539519/hämoglobin+synthese+und+abbau>, verfügbar am 20.06.2022
- [38] D. Labudde, M. Mohaupt, Blut und dessen Farbstoffe in der Forensik. In: Bioinformatik im Handlungsfeld der Forensik, Springer-Verlag Berlin (2018).
- [39] C. C. Winterbourn, [26] Oxidative reactions of hemoglobin. In: Methods in Enzymology 186, Academic Press (1990) 265-272.
- [40] R. H. Bremmer, D. M. De Bruin, M. De Joode, W. J. Buma, T. G. Van Leeuwen, M. C. Aalders, Biphasic oxidation of oxy-hemoglobin in bloodstains, PloS one 6 (7) (2011) e21845.
- [41] <https://www.blutwert.net/haemoglobin/>, verfügbar am 27.06.2022
- [42] A. Marrone, J. Ballantyne, Changes in dry state hemoglobin over time do not increase the potential for oxidative DNA damage in dried blood, PLoS ONE 4 (2009) pe5110.
- [43] P. Wörfel, M. Bitzer, U. Claus, H. Felber, M. Hübel, B. Vollenweider, Laborpraxis: 4 Analytische Methoden, 4. Aufl., Springer-Verlag Basel (1990) 159-215
- [44] P. Sweigert, Z. Xu, Y. Hong und S. Swavey, „Nickel, copper, and zinc centered ruthenium-substituted porphyrins: effect of transition metals on photoinduced DNA cleavage and photoinduced melanoma cell toxicity,“ Dalton Trans. 41 (17), 5201-5208 (2012).
- [45] T. Asakura, K. Minakata, K. Adachi, M. Russel, E. Schwartz, Denaturated hemoglobin in sickle erythrocytes, J. Clin. Invest. 59 (4) (1977) 633-640.
- [46] E. A. Rachmilewitz, J. Peisach, W. E. Blumberg, Studies on the Stability of Oxy-hemoglobin A and Its Constituent Chains and Their Derivates. In: The Journal of Biological Chemistry, Vol 246, No. 10 (1971) 3356-3366
- [47] TRBA
- [48] [https://www.chemie.de/lexikon/Destilliertes\\_Wasser.html](https://www.chemie.de/lexikon/Destilliertes_Wasser.html), verfügbar am 19.7.2022

- 
- [49] R. Brinkman, Hämolyse. In: et al. Blut und Lymphe. Handbuch der Normalen und Pathologischen Physiologie, vol 6/1. Springer, Berlin, Heidelberg. (1928) 567-585
- [50] <https://www.sustainable-desalination.net/wp-content/uploads/2013/05/UV-1800.pdf>, verfügbar am 19.07.2022
- [51] <https://labotec.com.vn/product/uv-vis-spectrophotometer-uv-1800/>, verfügbar am 19.07.2022
- [52] [https://www.amazon.de/DOQAUS-Thermo-Hygrometer-Feuchtigkeit-Raumthermometer-Luftfeuchtigkeitsmessgerät/dp/B09PH91HX2/ref=pd\\_sbs\\_sccl\\_3\\_3/261-0115240-1621059?pd\\_rd\\_w=TZrW7&content-id=amzn1.sym.7f94352d-8ab6-4a04-85b6-19c91c345217&pf\\_rd\\_p=7f94352d-8ab6-4a04-85b6-19c91c345217&pf\\_rd\\_r=QSJC7JKZGRRWDCH0GNYE&pd\\_rd\\_wg=D7T9C&pd\\_rd\\_r=22b3a656-8b9c-41e9-bdf9-0f3add992724&pd\\_rd\\_i=B09PH91HX2&th=1](https://www.amazon.de/DOQAUS-Thermo-Hygrometer-Feuchtigkeit-Raumthermometer-Luftfeuchtigkeitsmessgerät/dp/B09PH91HX2/ref=pd_sbs_sccl_3_3/261-0115240-1621059?pd_rd_w=TZrW7&content-id=amzn1.sym.7f94352d-8ab6-4a04-85b6-19c91c345217&pf_rd_p=7f94352d-8ab6-4a04-85b6-19c91c345217&pf_rd_r=QSJC7JKZGRRWDCH0GNYE&pd_rd_wg=D7T9C&pd_rd_r=22b3a656-8b9c-41e9-bdf9-0f3add992724&pd_rd_i=B09PH91HX2&th=1), verfügbar am 19.07.2022
- [53] <https://www.lernhelfer.de/schuelerlexikon/chemie-abitur/artikel/spektroskopische-analysemethoden-uv-vis-spektroskopie-und#>, verfügbar am 26.09.2022
- [54] M. A. Ibrahim, M. I. El-Gohary, N.A. Saleh, M.Y. Elashry, Spectroscopic study an oxidative reactions of normal and pathogenic hemoglobin molecules. In: Romanian J. Biophys., Vol. 18, No. 1, Bukarest (2008) 39–47
- [55] J. Möhler, Spektroskopische Featuredetektion zur Altersbestimmung von Humanblutproben im Labor und am Tatort, Mittweida (2019)
- [56] J. Krause, Spektroskopische Analysen humanen Vollblutes zur Analyse der Einflussnahme von Luftfeuchtigkeit und Sonneneinstrahlung auf alterskorrelierende Features, Mittweida (2020)

# Anlagen, A1

Enthalten ist das *RStudio* Skript zum Normalisieren und Visualisieren der Daten

```
library(dplyr)
library(tidyr)
library(tidyverse)
library(ggforce)

#Daten einlesen
orig_daten <- read.csv2("Daten/Daten 15 ml.csv")

#Daten transformieren
orig_daten <- orig_daten %>%
  pivot_longer(-Wellenlänge, names_to = "Datum", values_to = "Messpunkte")

#Datum konvertieren
orig_daten$Datum <- sub("X", "", orig_daten$Datum)
orig_daten$Datum <- as.Date(orig_daten$Datum, "%d.%m.%Y")
orig_daten$Datum <- as.factor(orig_daten$Datum)

#Arbeitskopie anlegen
daten <- orig_daten

#Messpunkte Ausreißer oberhalb/ unterhalb Grenzwert filtern
max_m <- 5
daten <- subset(daten, Messpunkte >= -max_m)
daten <- subset(daten, Messpunkte <= max_m)

#Wellenlänge minimal 250 filtern
min_w <- 250
daten <- subset(daten, Wellenlänge >= min_w)

#Datumswerte der Messungen ermitteln
messdatum <- unique(daten$Datum)

# Normierungsfunktion
normierung <- function(df, variante){
  if(variante == 'v2'){
    df$Messpunkte <- scales::rescale(df$Messpunkte, to=c(0,1))
  }
  return(df)
}

nvar <- 'v2'

#alle Messreihen einzeln normieren und mit rbind wieder zusammenfügen
daten <- rbind(normierung(subset(daten, Datum == messdatum[1]), nvar),
  normierung(subset(daten, Datum == messdatum[2]), nvar),
  normierung(subset(daten, Datum == messdatum[3]), nvar),
```



```

normierung(subset(daten, Datum == messdatum[4]), nvar),
normierung(subset(daten, Datum == messdatum[5]), nvar),
normierung(subset(daten, Datum == messdatum[6]), nvar),
normierung(subset(daten, Datum == messdatum[7]), nvar),
normierung(subset(daten, Datum == messdatum[8]), nvar),
normierung(subset(daten, Datum == messdatum[9]), nvar))

# Grafikfunktion mit 2 Varianten (Punkte oder Linie)
grafik <- function(df, xval, yval, cval, gnam, variante,
                  zoom, z_xlim, z_ylim, z_breaks, z_size){
  #Grafik erstellen
  p <- df %>%
    ggplot(mapping = aes(x = xval,
                        y = yval,
                        color = cval,
                        fill = cval)) +
    xlab(gnam[1]) + ylab(gnam[2]) + labs(color=gnam[3])

  #Zoom ergänzen, wenn eingeschaltet
  if(zoom[1] == 1){
    #Messwerte als Punkte
    p <- p +
      facet_zoom(xlim = z_xlim, ylim = z_ylim, zoom.size = z_size,
                split = FALSE, horizontal = FALSE) +
      scale_x_continuous(breaks = z_breaks)
  }

  #Ausführung der Normierung je nach übergebener Variante
  if(variante == 'P'){
    #Messwerte als Punkte
    p + geom_jitter()
  }else{
    #Messwerte als Linie
    p + geom_line()
  }
}

#Ausgabe einschränken auf ein Datum (1..9) oder alles (0) ausgeben
messreihe <- 0 #alles oder Einzelmessung 1 bis 9
if(messreihe == 0){
  datenset <- daten
}else{datenset <- subset(daten, Datum == messdatum[messreihe])}

#Grafikvariante festlegen ('L' oder 'P')
gvar <- 'L'
gnam <- c('Wellenlänge', 'Messpunkte normiert', 'Datum der Messung')

#Parameter für Zoom
#zoom einschalten: 1, ausschalten: 0
zoom <- 0
xlim <- c(500, 650)

```

---

```
ylim <- c(0.00, 0.125)
peaks <- c(499, 542, 576, 626)
zoomsize <- 0.5 #Verhältnis Zoom-Bereich zum Originalbereich

#Grafik erstellen ohne Zoom
grafik(datenset, datenset$Wellenlänge, datenset$Messpunkte, datenset$Datum,
       gnam, gvar, zoom, xlim, ylim, peaks, zoomsize)

#Speichern des Plots als Bild
ggsave(filename = "Daten/Daten 15 ml.pdf", plot = last_plot())

#Grafik mit Zoom erstellen
zoom <- 1
grafik(datenset, datenset$Wellenlänge, datenset$Messpunkte, datenset$Datum,
       gnam, gvar, zoom, xlim, ylim, peaks, zoomsize)

#Speichern des Plots mit Zoom als Bild
ggsave(filename = "Daten/Daten 15 ml_zoom.pdf", plot = last_plot())
```

## Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Chemnitz, 22.11.2022

Ort, Datum

