

A study on preparation of luminol reagents for crime scene investigation

Seung Lim, Jung-mok Kim, Ju Yeon Jung¹, and Si-Keun Lim¹★

Scientific Investigation Section, Detective Division, Gyeongnam Provincial Police Agency, Changwon 51154, Korea

¹*Forensic DNA Division, National Forensic Service, Wonju 26460, Korea*

(Received November 22, 2017; Revised January 16, 2018; Accepted January 18, 2018)

범죄현장 조사용 루미놀 시약의 제조법에 관한 연구

임 승·김정목·정주연¹·임시근¹★

경남지방경찰청 형사과 과학수사계, ¹국립과학수사연구원 법유전자과

(2017. 11. 22. 접수, 2018. 1. 16. 수정, 2018. 1. 18. 승인)

Abstract Finding the blood left at a crime scene is very important to reconstruct or solve a criminal case. Although numerous reagents have been developed for use at crime scenes, luminol is the most representative. Bluestar Forensic has been used in recent years, but is expensive and cannot be stored after preparation. This study aims to develop a new luminol reagent that can be stored for a long period of time while maintaining the chemiluminescence intensity at the level of Bluestar Forensic. Because luminol dissolves well in aqueous alkaline solutions, the use of sodium hydroxide in the preparation of luminol reagents can promote the decomposition of hydrogen peroxide. Magnesium sulfate, sodium silicate, and potassium triphosphate have been used as hydrogen peroxide stabilizers. The effects of the addition of these substances on the chemiluminescence emission intensity and the storage period of the luminol reagents were confirmed. The addition of a hydrogen peroxide stabilizer was shown to have no significant affect on the chemiluminescence emissions intensity or stabilized pH of the luminol reagent during storage. It also greatly increases the shelf life of the reagents. The use of magnesium sulfate as a hydrogen peroxide stabilizer is the most appropriate. When sodium perborate is used instead of hydrogen peroxide as an oxidizing agent, there is no significant change in the sensitivity and chemiluminescence emissions intensity, but the storage period is shortened. However, after the reaction with blood, the pH of the mixed solution does not increase significantly, and is judged to be more suitable than a reagent made of hydrogen peroxide.

요 약: 사건 현장에 남겨진 혈흔을 찾는 것은 사건을 재구성하거나 해결하기 위해서 매우 중요하다. 사건현장에서 사용할 수 있는 수많은 시약들이 개발되었지만, 루미놀이 가장 대표적인 시약이라고 할 수 있다. 최근에는 블루스타라는 시약이 주로 사용되고 있지만, 가격이 비싸고 시약을 제조한 후 보관이 불가능하다는 단점이 있다. 본 연구에서는 블루스타 수준의 발광강도를 유지하면서 제조 후 장시간 보관할

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)33-902-5716 Fax : +82-(0)33-902-5941

E-mail : neobios@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

수 있는 새로운 루미놀 시약을 개발하고자 했다. 루미놀은 알칼리 수용액에서 잘 녹기 때문에, 시약을 제조할 때 수산화나트륨의 사용은 과산화수소의 분해를 촉진시킬 수 있다. 루미놀 시약을 제조할 때 과산화수소 안정화제로 황산마그네슘, 규산나트륨, 삼인산칼륨을 농도별로 첨가한 후, 혈흔과 반응할 때 시약의 발광강도 및 보관기간에 미치는 영향을 확인했다. 과산화수소 안정화제 첨가는 발광강도에 별다른 영향을 주지 않았고, 보관 중 루미놀 시약의 pH를 일정하게 유지시켜 줌으로서 시약의 보관기간을 크게 늘려줬다. 과산화수소 안정화제로 황산마그네슘이 가장 적절하였다. 과산화수소 대신 과붕산나트륨을 산화제로 사용했을 경우, 희석 혈흔에 대한 민감도와 발광강도에 큰 변화는 없었지만 제조 후 보관기간이 단축되었다. 그렇지만, 혈흔과 반응한 후 혼합액의 pH 상승 폭이 과산화수소로 제조한 시약보다 줄어들었다.

Key words: luminol, hydrogen peroxide stabilizer, magnesium sulfate, chemiluminescence emission intensity, sodium perborate monohydrate

1. 서 론

사건 현장에서 눈에 보이지 않는 혈흔이나 용의자, 피해자 또는 특정 물건과 차량 등에서 혈흔을 찾는 것은 매우 중요한 일로서 이를 적절한 방법으로 채취하고 보존하는 것은 사건을 재구성하고 나아가 피의자를 밝히는데 중요한 역할을 한다.

혈흔의 존재 여부를 확인하고, 눈에 보이지 않는 혈흔을 찾기 위해서 다양한 시약들이 개발되었고 사건 현장에서 사용되고 있지만, 그 중에서 루미놀이 가장 대표적인 시약이라고 할 수 있다. 혈흔과 반응 할 때 루미놀의 화학적 발광과 관련하여 1951년, Grodsky에 의해 루미놀에 탄산나트륨과 과붕산나트륨을 혼합하여 제조하는 방법이 제안되었고, 이는 탄산나트륨이 헤모글로빈의 산화과정에서 느린 반응을 일으켜 짧은 지속시간을 가져오고 독성을 유발한다는 단점이 있었다. 1966년, Weber에 의해 제안된 과산화수소, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨을 루미놀에 혼합하는 방법은 시약의 수명이 짧다는 단점이 있었으며, 이후 루미놀 시약의 발광강도를 높이고 오류반응을 낮추기 위한 다양한 제조법들이 연구되었다. 최근에는 블루스타란 특허 제품이 제조 편리성과 뛰어난 발광강도, 혈흔 DNA를 파괴하지 않는다는 장점 때문에 사건 현장에서 가장 많이 사용되고 있다.¹⁻⁹

루미놀 시약을 제조 할 때 산화제로 첨가되는 과산화수소는 물보다 점성이 약간 높은 액체로, 물, 에탄올, 에테르에 잘 녹으며 수용액에서 수소이온 일부가 해리되어 약한 산성을 띤다. 과산화수소는 알칼리 수용액에서는 쉽게 분해되나 산성 수용액에서는 비교적 안정하다.¹⁰ Park 등의 연구결과에 의하면 pH 10.0~10.6 조건에서 과산화수소의 분해는 수산화나트륨 수

용액에서보다 탄산나트륨 수용액에서 9 배 정도 빨랐다. 또한 알칼리제로 탄산나트륨을 사용할 경우에는 과산화수소 안정화제 첨가에 의해서도 분해가 억제되지 않았다.¹¹ 루미놀은 알칼리 조건에서 용해되며, 혈흔과 반응할 때 발광강도는 시약의 pH에 비례해서 증가하므로 사건 현장에서 혈흔을 찾기 위한 목적이라면 pH를 높여 제조해야 하는 것이 바람직하다.¹² 수용액의 pH 높이기 위해서는 알칼리제로 탄산나트륨보다는 수산화나트륨과 같은 강염기를 사용하지만, 시약의 pH를 높이면 시약에 포함된 과산화수소의 분해속도가 빨라지기 때문에 통상적으로 수용액 중에서 과산화수소 분해를 막아줄 수 있는 황산마그네슘과 같은 물질을 첨가하게 된다.¹³⁻¹⁶ 알칼리 pH는 과산화수소의 분해를 증가시키는 것 이외에도 혈흔에 포함되어 있는 DNA를 파괴할 수 있기 때문에 사건 현장에서 사용하기 위해서는 시약의 pH 조건을 고려해야 한다.¹⁷⁻¹⁸

본 실험에서는 하이포아염소산나트륨에 의한 루미놀 시약의 오류반응을 줄여줄 수 있다고 보고된 글리신¹⁹과 pH 완충제로서 제이인산나트륨을 이용해 루미놀 시약의 pH를 조절한 후, 알칼리 수용액에서 과산화수소의 분해를 막기 위해서 첨가한 황산마그네슘, 삼인산화칼륨, 규산나트륨이 루미놀 시약의 발광강도에 미치는 영향을 확인하였고, 산화제로 과산화수소 대신 과붕산나트륨 1수화물의 사용 가능성을 확인했다. 본 실험의 목적은, 범죄현장에서 혈흔을 찾는데 사용할 수 있는 새로운 루미놀 시약의 제조법을 개발하는데 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 장비

수산화나트륨(sodium hydroxide), 삼인산칼륨(pota-

ssium phosphate tribasic, PPT), 황산마그네슘 7수화물 (magnesium sulfate heptahydrate, MS), 규산나트륨 (sodium silicate, SS), 탄산나트륨(sodium carbonate)은 덕산화학(Korea)에서 과산화수소(hydrogen peroxide), 글리신(glycine), 과붕산나트륨 1수화물(sodium perborate monohydrate, SPM), 제이인산나트륨 7수화물(sodium phosphate dibasic heptahydrate, SPD)은 Acros(USA)에서 구입, 루미놀(3-aminophthalhydrazide, luminol)은 삼천화학(Korea) 제품을 사용하였다. 블루스타(Sirchie, USA)는 아이디테크사에서 구입하였다.

혈흔 샘플의 제조에 페이퍼 디스크(paper disc 10 mm, Aavantec, Japan)와 교반기(KMC-1300V, Vison, Korea)를 사용하였고, 시약 제조 및 반응 중 pH를 측정하기 위해서 pH meter (pH-200L, iSTEK, Korea)를 사용하였다.

2.2. 희석 혈흔 샘플의 제조

실험에 사용한 혈액은 국립과학수사연구원의 IRB 승인을 받아 3명의 지원자로부터 채취되었다. 채혈된 혈액은 EDTA 튜브에 넣은 후, 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 30일 이상이 경과하면 폐기하였다.

희석 배수는 전체 부피에서 혈액이 차지하는 비율로, 혈액 1 mL에 증류수 9 mL을 첨가하여 1:10 배의 혈액 희석액을 제조하였다. 1:10 배의 혈액 희석액 1 mL에 9 mL의 증류수를 가해 1:100 배 혈액 희석액을 제조하였으며, 동일한 방법으로 1:1,000배, 1:10,000 배, 1:100,000 배의 혈액 희석액을 제조하였다. 마이크로펫을 이용해 각각의 혈액 희석액을 페이퍼 디스크에 100 µL 씩 떨어뜨린 후 실온에서 건조하여 희석 혈흔 샘플을 제조하였다.

2.3. 시약의 제조법

실험을 위해 3 가지 제조법을 기본 제조법으로 선택 사용하였다. L형은 2000년 후반까지 경찰청에서 사용하던 제조법이며, L-1형은 Weber기법을 변형해 만든 제조법으로 산화제로 과산화수소를 사용했으며 L-2형은 산화제로 과산화수소 대신 과붕산나트륨을 사용한 것이다. L-1과 L-2형 시약의 최종 pH는 11.4 ~11.7이다.

- L형 : 루미놀 1 g, 탄산나트륨 50 g, 과산화수소 150 mL, 증류수 1 L
- L-1형(weber법 변형) : 루미놀 1 g, 수산화나트륨 3 g, 글리신 1 g, 과산화수소 10 mL, 증류수 1 L
- L-2형 : 루미놀 1 g, 수산화나트륨 3 g, 글리신 2 g, 과붕산나트륨 1수화물 10 g, 증류수 1 L

2.4. 혈흔 반응 및 촬영 조건

루미놀 시약의 발광강도를 확인하고 촬영하기 위해서 암실을 이용하였다. 혈흔 샘플에 루미놀 시약을 100 µL 떨어뜨린 후 관찰, 촬영하였고, 혈흔과 반응 시 발광강도를 객관적으로 비교하기 위해서 캐논 EOS70D 카메라의 촬영조건을 ISO 400, F 11, S 30"로 고정하였다.

2.5. 과산화수소 안정화제 첨가에 따른 루미놀 시약의 pH 변화

알칼리제를 이용해 루미놀 시약을 제조하면 보관하는 도중에 시약의 pH가 점차 높아지는데, 과산화수소의 분해에 따른 결과로 판단된다. 과산화수소 분해를 막기 위해 과산화수소 안정화제를 첨가하여 루미놀 시약을 제조 한 후 pH meter를 이용하여 보관 중 시약의 pH 변화를 확인하였다. 실험에 사용한 기본 제조법은 L-1형이며 과산화수소 안정화제로 황산마그네슘 7수화물은 0.1~1 g/L, 삼인산칼륨은 0.5~10 g/L, 규산나트륨은 0.5~10 g/L를 첨가하였다. 제조한 각각의 루미놀 시약은, 2 °C로 설정된 냉장고에 보관하면서 pH를 측정하였다.

2.6. 보관 기간에 따른 루미놀 시약의 혈흔 민감도 변화

과산화수소 안정화제를 첨가하여 제조한 루미놀 시약과 L-2형 루미놀 시약의 시간 경과에 따른 혈흔 민감도 변화를 확인하기 위해서 1:10 배~1:10,000 배로 제조한 희석 혈흔 샘플을 이용하였다. 보관 중 혈흔 민감도 변화를 확인하기 위해 사용한 루미놀 시약은 블루스타, L형, L-1형과 L-1형에 과산화수소 안정화제로 황산마그네슘 7수화물, 규산나트륨, 삼인산칼륨을 첨가하여 제조한 6 종류와, L-2형, L-1형과 L-2형에 제이인산나트륨을 5 g/L 첨가해 제조한 루미놀 시약 등 총 12 종 이었다. 모든 루미놀 시약들은 제조한 후 상온에서 보관 실험하였고, 희석 혈흔 샘플에 루미놀 시약 100 µL를 떨어뜨린 후 정해진 조건에서 사진 촬영하여 발광강도를 비교하였다.

2.7. 혈액과 반응 후 루미놀 시약의 pH 변화

루미놀 시약이 혈액과 반응하면 시약에 포함된 산화제가 분해되므로 시약의 pH가 상승할 것으로 생각되며, pH의 상승은 혈흔 DNA에 영향을 줄 가능성이 높다고 판단되어 혈액과 반응 후 루미놀 시약의 pH 변화를 확인하였다. 1:5 배로 희석한 혈액과 루미놀

시약을 각각 5 mL씩 섞은 후 상온에 보관하면서 시간 경과에 따른 용액의 pH 변화를 측정하였다. 블루스타와 L-1형에 황산마그네슘을 첨가한 루미놀 시약, 과붕산나트륨을 산화제로 사용한 L-2형, 상기 루미놀 시약에 제이인산나트륨을 5 g/L씩 첨가해 제조한 루미놀 시약 등 총 5 종류의 시약을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 과산화수소 안정화제 첨가에 따른 루미놀 시약의 pH 변화

알칼리 수용액에서 과산화수소의 분해를 억제하기 위해 황산마그네슘 7수화물, 규산나트륨, 삼인산칼륨을 농도별로 첨가한 후 시간 경과에 따른 시약의 pH 변화를 관찰하였다.

황산마그네슘 7수화물은 마그네슘 2가 양이온이 포함되어 있음에도 불구하고 루미놀 시약과 오류반응을 일으키지 않았다. Fig. 1에 보이듯이 안정화제를 첨가하지 않은 루미놀 시약은 제조 후 급격한 pH 변화를 보였으며 11일 경과했을 때 시약의 pH가 12를 초과하였다. 그에 반해, 황산마그네슘 7수화물을 0.1 g/L 이상을 첨가한 시약은 pH가 안정되었고, 11일 보관 후에도 제조 당시 pH를 유지하였다. 황산마그네슘 첨가량을 높일 경우 시약의 pH 안정화에는 별다른 영향을 주지 않았지만 용해되지 않은 양이 증가했고 제조할 때 시약의 pH가 다소 낮아졌다. 실험 결과를 통해, 루미놀 시약에 포함된 과산화수소를 안정화시키는데 황산마그네슘 농도는 0.1~0.3 g/L 정도가 적정하다고 판단하였다.

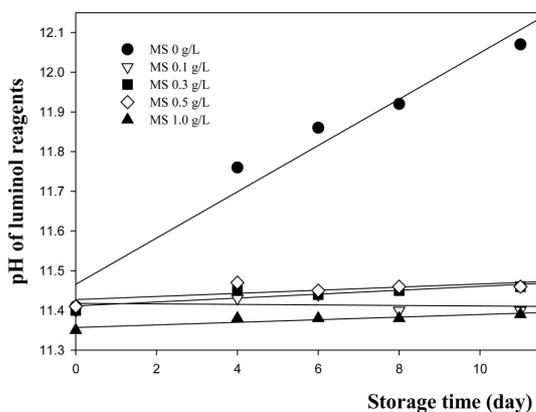


Fig. 1. pH changes of L-1 reagents prepared by various magnesium sulfate (MS) contents during storage.

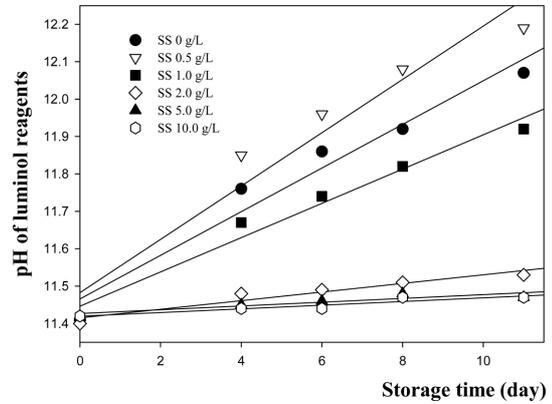


Fig. 2. pH changes of L-1 reagents prepared by various sodium silicate (SS) contents during storage.

과산화수소 안정화제로 규산나트륨을 사용할 경우, 첨가량에 따른 보관 중 시약의 pH 변화는 Fig. 2에서 볼 수 있다. 첨가량이 많아질수록 pH 상승이 억제되었다. 규산나트륨을 5 g/L 첨가해 제조한 루미놀 시약의 초기 pH는 11.42였고 11일 보관한 후 pH는 11.47였다. 규산나트륨을 5 g/L 이상 첨가해 제조했을 경우에는 시약의 pH 증가를 억제하는 효과가 현저했으므로, 규산나트륨 역시 과산화수소 안정화제로 효과적임을 알 수 있었다.

삼인산칼륨은 루미놀 시약의 pH 안정화에 미치는 효과가 매우 미미했고, 5 g/L 이하로 첨가했을 때는 첨가하지 않는 루미놀 시약의 pH 변화와 거의 유사했다. 10 g/L 농도로 첨가했을 때는 시약의 pH 증가를 다소 억제시키긴 했지만, 11일 보관 후 시약의 pH가

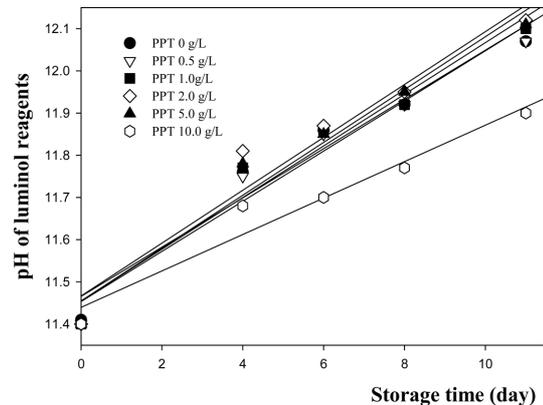


Fig. 3. pH changes of L-1 reagents prepared by various potassium phosphate (PPT) tribasic contents during storage.

11.87였다. 삼인산칼륨을 루미놀 시약에 포함된 과산화수소의 안정화제로 사용하기 위해서는 첨가량을 10 g/L 이상으로 높여야 할 것으로 판단하였다(Fig. 3). 루미놀 시약을 제조할 때 첨가한 물질 중에서 시약의 pH에 큰 영향을 줄 수 있는 물질은 과산화수소가 유일하므로 보관 중 시약의 pH 상승은 과산화수소 분해의 결과로 판단된다.

3.2. 보관에 따른 루미놀 시약의 민감도 변화

루미놀 시약은 제조 후 보관하면서 사용하게 되면 혈흔에 대한 민감도가 급격히 떨어지므로 필요할 때마다 새롭게 제조해야 한다. 블루스타는 제조 후 일정

기간 보관하면서 사용할 수 있다고 알려져 있지만, 보관에 따른 혈흔 민감도 및 발광강도 변화에 대한 실험 자료는 없다. 본 실험에서는 블루스타 및 과산화수소 안정화제를 첨가해 pH 변화를 억제시킨 루미놀 시약의 보관 기간에 따른 희석 혈흔에 대한 민감도 변화를 확인하였다.

Table 1-3은 제조 당시와 3일, 9일 동안 보관 한 후 루미놀 시약들의 1:10 배~1:100,000 배로 희석된 혈흔에 대한 민감도를 보여준다. 블루스타의 시약의 제조 당시 pH는 11.4~11.8였고, 보관하는 동안 pH 변화는 거의 없었다. 블루스타는 제조 당시 1:10,000 배로 희석된 혈흔 샘플까지 확인이 가능 했지만, 보관 도중에

Table 1. Chemiluminescence emission intensity of luminol reagents during storage (0 day)

	Blood dilution ratio				
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000
Whole blood					
BlueStar®					
L					
L-1					
L-1 + MS 0.3 g/L					
L-1 + MS 1 g/L					
L-1 + PPT 2 g/L					
L-1 + PPT 10 g/L					
L-1 + SS 2 g/L					
L-1 + SS 10 g/L					

Table 2. Chemiluminescence emission intensity of luminol reagents during storage (3 day)

	Blood dilution ratio				
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000
Whole blood					
BlueStar [®]					
L					
L-1					
L-1 + MS 0.3 g/L					
L-1 + MS 1 g/L					
L-1 + PPT 2 g/L					
L-1 + PPT 10 g/L					
L-1 + SS 2 g/L					
L-1 + SS 10 g/L					

희석 혈흔에 대한 민감도가 급격히 감소했고 3일 후에는 혈흔과 거의 반응하지 않았다. 1990년대부터 경찰청에서 사용하던 루미놀 시약은 제조 당시 1:1,000 배 정도로 희석된 혈흔 샘플까지 확인할 수 있었지만, 발광강도가 매우 약해서 사진촬영을 위해서 암실이 별도로 필요했고, 3일이 경과하면 혈흔과 전혀 반응하지 않았다. 결과를 바탕으로 경찰청에서 사용하는 루미놀 시약은 제조 즉시, 블루스타의 경우 최대 1일 동안 보관하면서 사용하는 것이 가능하다고 생각되었다.

L-1형은 시약을 제조했을 때에 1:10,000 배로 희석된 혈흔 샘플 확인이 가능했지만, 9일 경과한 후에는 발광강도가 다소 떨어져 1:1,000 배로 희석된 혈흔 샘플

플까지만 확인 가능했다. 보관하는 동안에 혈흔 민감도가 10 배 정도 감소하였다. L-1형에 과산화수소 안정화제를 첨가한 6종의 루미놀 시약들의 제조 당시 혈흔 민감도는 L-1형과 모두 동일하였다. L-1형에 황산마그네슘 7수화물을 0.3 g/L, 1 g/L 첨가하여 제조한 시약은 9일이 경과했을 때도 희석 혈흔에 대해 동일한 수준의 발광강도를 보였고, 1:10,000 배 희석된 혈흔 샘플도 확인이 가능하였다. L-1형에 규산나트륨을 2 g/L, 10 g/L로 첨가해 제조한 루미놀 시약 역시 제조 후 9일이 경과해도 제조 당시와 유사한 발광강도와 희석 혈흔에 대한 민감도를 나타냈다. 그렇지만, L-1형에 삼인산칼륨을 2 g/L, 10 g/L 첨가해 제조한

Table 3. Chemiluminescence emission intensity of luminol reagents during storage (9 day)

	Blood dilution ratio				
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000	1:100,000
Whole blood					
BlueStar [®]					
L					
L-1					
L-1 + MS 0.3 g/L					
L-1 + MS 1 g/L					
L-1 + PPT 2 g/L					
L-1 + PPT 10 g/L					
L-1 + SS 2 g/L					
L-1 + SS 10 g/L					

루미놀 시약은 L-1형에 비해 보관 도중 혈흔 민감도 변화가 컸고, 9일이 경과했을 때 1:1000배로 희석된 혈흔 샘플만 확인 가능한 수준이었을 뿐만 아니라 L-1형에 비해 발광강도 역시 매우 낮았다. 보관 중 pH 변화가 더 적었던 10 g/L 첨가해 제조한 시약의 혈흔 민감도가 2 g/L 첨가해 제조한 시약보다 더 빠르게 감소했다. 삼인산칼륨은 pH 안정화와 상관없이 시약에 좋지 않은 영향을 주므로 과산화수소 안정화제로 사용하지 않아야 함을 알 수 있었다. 본 실험을 통해, 보관 중 루미놀 시약의 pH 변화와 시약의 혈흔 민감도 변화는 어느 정도 상관성이 있다고 판단되었다. 루미놀 시약에 첨가되는 산화제로 과산화수소를 선택한

다면 제조 시에 안정화제가 첨가되어야 함을 알 수 있었다.

Table 4는 산화제로 과산화수소 대신 과붕산나트륨과 pH 조절제로 제이인산나트륨을 사용해서 제조한 루미놀 시약들의 희석 혈흔에 대한 발광강도 및 민감도를 보여준다. L-1형에 황산마그네슘 7수화물을 0.3 g/L 첨가한 후 제이인산나트륨을 5 g/L 첨가해 제조한 시약과 L-2형 및 L-2형에 제이인산나트륨을 5 g/L 첨가한 시약 모두 L-1형과 비슷한 수준의 발광강도와 혈흔 민감도를 나타냈고 5일 보관 후에도 발광강도에 큰 변화 없이 1:10,000 배로 희석된 혈흔까지 확인이 가능하였다. 루미놀 시약을 제조 할 때 산화제

Table 4. The chemiluminescence emission intensity of luminol reagent during storage a) 0 day, b) 5 day

	Blood dilution ratio			
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000
L-1 + MS 3 g/L + SPD 5 g/L				
L-2				
L-2 + SPD 5 g/L				

	Blood dilution ratio			
	1:10	1:100	1:1,000	1:10,000
L-1 + MS 3 g/L + SPD 5 g/L				
L-2				
L-2 + SPD 5 g/L				

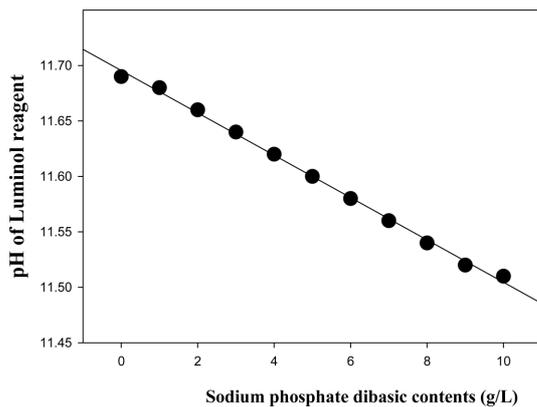


Fig. 4. pH change of L-2 reagent by addition of sodium phosphate dibasic (SPD).

로 과산화수소 대신 과붕산나트륨의 사용이 가능하다는 사실을 확인할 수 있었다. 글리신과 비슷하게 시약의 pH를 보정하기 위해서 사용한 제이인산나트륨은

첨가량이 증가함에 따라 시약의 pH가 감소하긴 했지만(Fig. 4) 첨가량에 비해 큰 변화를 나타내지 않았다. 또한, 루미놀 시약의 발광강도와 희석 혈흔 민감도에 큰 영향을 주지 않았기 때문에, 루미놀 시약 제조 시에 pH 조절제로 사용이 가능하다고 판단하였다.

3.3. 혈액과 반응 후 루미놀 시약의 pH 변화

Fig. 5는 1:5 배로 희석한 혈액 5 mL과 블루스타, L-1형, L-2형, L-1형과 L-2형에 제이인산나트륨을 5 g/L 첨가하여 제조한 각각의 루미놀 시약을 5 mL씩 섞은 후 5일 동안 상온에 보관했을 때 시간 경과에 따른 혼합액의 pH 변화를 보여준다. 블루스타는 제조 당시의 pH가 11.62, 혈액과 반응한 후 10분 경과했을 때 12.12, 5일 경과 했을 때 12.4로 0.78의 pH 변화를 나타냈다. L-1형은 제조 당시의 pH가 11.22였지만 반응 10분 후에는 12.06, 5일 경과했을 때 12.43으로 1.21의 pH 변화를 보였다. L-1형에 제이인산나트륨을

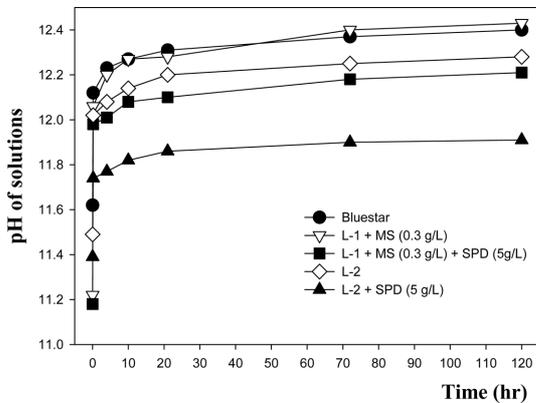


Fig. 5. pH changes of luminol reagents reacted with diluted blood (1 : 5 ratios) by time.

첨가한 시약은 제조 당시의 pH는 11.18, 반응 10분 후에는 11.98, 5일 후에는 12.21로 1.03의 pH 변화를 나타냈다. L-2형은 제조 당시 pH가 11.49였고 반응 10분 후에는 12.08, 5일 경과 후에는 12.28로 0.79의 pH 변화를 나타냈다. L-2형에 제이인산나트륨을 첨가한 시약은 제조 당시의 pH가 11.39, 반응 10분 후에는 11.74, 5일 후에는 11.91로 0.52의 pH 변화를 보였다. L-1형의 경우 제이인산나트륨 첨가와와는 상관없이 혈액과 반응한 후 pH 변화 폭이 상대적으로 컸지만, 과산화수소 대신 과붕산나트륨 1수화물을 사용해 제조한 L-2형은 제이인산나트륨 첨가와 상관없이 L-1형에 비해 pH 변화가 작다는 점을 확인할 수 있었다. 또한, 시약을 제조할 때 제이인산나트륨을 첨가하면 루미놀 시약과 혈액 반응에 따른 혼합액의 pH 변화를 더 줄일 수 있음을 확인하였다. 루미놀 시약과 혈액 혼합액의 최종 pH는 쉽게 제어할 수 없기 때문에 제조할 때 루미놀 시약의 pH는 고려해야 할 사항이며, 혈흔 민감도에 큰 영향을 주지 않는 범위에서 제이인산나트륨과 같이 첨가했을 때 시약의 pH에는 큰 변화 없이 혈액과 반응 후 pH 변화를 줄여줄 수 있는 물질의 첨가가 필요할 것이라고 생각된다.

4. 결 론

본 연구는 과산화수소 안정화제 첨가가 루미놀 시약의 회색 혈흔에 대한 민감도, 보관 시 발광강도 및 민감도 변화에 미치는 영향을 확인하고 산화제로서 과붕산나트륨 1수화물의 사용 가능성을 확인한 것이다.

루미놀 시약의 회색 혈흔에 대한 발광강도 및 민감도는 시약의 pH에 의존한다는 연구결과¹²에 따라, 알

칼리제로 탄산나트륨 보다는 수산화나트륨을 사용하는 것이 좋지만 DNA분석에 영향을 줄 수 있기 때문에 제조 당시에 시약의 pH를 보정할 필요성이 있다고 생각된다. 본 실험에서는 글리신과 제이인산나트륨을 이용해 시약의 pH를 보정하였는데, 첨가량은 제조 당시 루미놀 시약의 pH 보다는 혈액과 반응한 후에 혼합액의 pH 변화를 기준으로 판단해야 한다. 루미놀 시약을 제조한 후 보관하면 약한 발광이 관찰되는데, 알칼리 수용액인 루미놀 시약에 포함된 과산화수소가 지속적으로 분해되어 루미놀이 산화되는 것으로 추정되므로 발광강도 및 혈흔 민감도에 영향을 주지 않는 범위 내에서 과산화수소 안정화제를 첨가하는 것이 필요하다고 생각된다. 루미놀 시약을 제조 할 때 황산마그네슘 7수화물을 0.1 g/L 이상 첨가하면 규산나트륨, 삼인산칼륨 보다 과산화수소 분해를 효과적으로 억제했고, 보관 중 루미놀 시약의 pH를 안정시켰다. 루미놀 시약의 pH 안정화는 보관 중에 루미놀 시약의 혈흔 민감도 및 회색 혈흔과 반응 시의 발광강도에 큰 영향을 줬다. 루미놀 시약의 pH 변화는 과산화수소 분해와 관련된다고 판단되어 결국, 과산화수소 안정화제 첨가는 혈흔 민감도와 제조 후 보관기간에 직접적인 영향을 준다고 생각하였다. 블루스타 역시 안정화제를 사용해 제조 한 다른 루미놀 시약들과 마찬가지로 보관 중 pH 변화가 거의 일어나지 않았지만, 제조 한 후 3일 이내에 혈흔과 더 이상 반응하지 않게 되었으므로 다른 반응기작을 갖는 것으로 추정된다. 혈액에 포함된 DNA를 파괴시키는 pH 범위는 정확하지 않지만, Shimamoto 등의 연구²⁰와 임 등의 연구결과에 따라 pH 12.2 이하로 추정된다. 본 실험에서 제시한 L-1형 또는 L-1형에 제이인산나트륨을 첨가한 루미놀 시약의 pH 상승폭은 L-2형 또는 L-2형에 제이인산나트륨을 첨가해 제조한 루미놀 시약의 pH 상승폭보다 크므로, 동일한 수준의 혈흔 민감도 및 발광강도를 얻을 수 있다면 루미놀 시약을 제조할 때 과붕산나트륨 1수화물을 산화제로 사용하는 하는 것이 바람직 할 것이다. 또한 루미놀 시약이 혈액과 반응한 후 과산화수소와 같은 산화제가 분해되어 루미놀 시약의 pH가 상승하는 것을 줄이기 위해서는 제이인산나트륨과 같은 물질의 사용을 고려해야 한다고 생각된다. 사건현장에서 눈에 보이지 않는 혈흔을 찾기 위해서는 시약의 혈흔에 대한 민감도 및 발광강도가 매우 중요하지만, 혈흔에 시약을 처리 했을 때 DNA 역시 파괴하지 않아야 한다. 이 때문에 본 실험에서 제시한 L-1형에 황산마그네슘과 제이인산나트륨

을 사용한 제조법 및 L-2형에 제이인산나트륨을 사용해 제조한 제조법이 DNA에 미치는 영향에 대한 추가 검토가 필요할 것이다.

References

1. L. J. Blum, P. Esperanca, and S. Rocqefelte, *Can. Soc. Foren. Sci. J.*, **39**(3), 81-100 (2006).
2. R. Cheeseman, *J. For. Ident.*, **49**(3), 261-268 (1999).
3. C. Nicloux and J. Bressler, *J. BPA*, **30**(3), 3-11 (2014).
4. S. S. Tobe, N. Watson, and N. N. Daeid, *J. Fore. Sci.*, **52**(1), 102-109 (2007).
5. T. I. Quickenden and P. D. Cooper, *Luminescence*, **16**, 251-253 (2001).
6. M. Grodsky, K. Wright, and P. L. Kirk, *J. Crim. Law Criminol.*, **42**, 94-104 (1951).
7. E. Karapazarlioglu, *J. Recent Sci. Res.*, **6**(3), 2986-2989 (2015).
8. L. Dilbeck, *J. For. Ident.*, **56**(5), 706-720 (2006).
9. <https://www.bluestar-forensic.com/gb/blustar-chemistry.php>, Assessed 5 January 2018.
10. https://en.wikipedia.org/wiki/hydrogen_peroxide, Assessed 23 October 2017.
11. H. B. Lee, A. H. Park, and C. Oloman, *Tappi J.*, **59**, 129-132 (2000).
12. J. Y. Noh, S. Lim, S. L. Kim, and S. K. Lim, *Korean J. Forensic Sci.*, **13**(1), 41-48 (2012).
13. O. Spalek, J. Balei, and I. Paseka, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1**(78), 2349-2359 (1982).
14. S. J. Kim and B. H. Yoon, *J. KTAPPI*, **38**(3), 79-84 (2006).
15. M. Wekesa, A. Habtewold, and J. Mirdaniali, *African J. Pure and Appl. Chem.*, **5**(7), 176-180 (2011).
16. J. Abbot and D. G. Brown, *Can. J. Chem.*, **68**, 1537-1543 (2011).
17. G. Patel and A. Hopwood, *Int. J. Legal. Med.*, **127**(4), 723-729 (2013).
18. http://www.forensic.sc.mahidol.ac.th/proceeding/51_kan-nika.pdf.
19. K. Richard and M. M. Gordon, *Talanta*, **67**, 345-353 (2005).
20. S. Shimamoto, C. S. Defrance, and T. W. Adair, *J. Assoc. Crime Scene Reconstr.*, **19**(2), 17-27 (2013).