

Effect of urea on blood-luminol chemiluminescence reaction

Youngpyo Bae and Sungwook Hong[★]

Graduate School of Forensic Science, Soonchunhyang University, Asan 31538, Korea

(Received June 20, 2023; Revised August 9, 2023; Accepted August 15, 2023)

Urea가 혈액-luminol 화학발광에 미치는 영향

배영표 · 홍성욱[★]

순천향대학교 법과학대학원

(2023. 6. 20. 접수, 2023. 8. 9. 수정, 2023. 8. 15. 승인)

Abstract: This study aimed to verify the hypothesis that urea denatures hemoglobin in the blood, thereby exposing active sites of enzymes and enhancing the chemiluminescence of the blood-luminol reaction. When blood was pretreated with urea, higher concentrations of pretreatment urea or longer pretreatment times resulted in enhanced chemiluminescence in the blood-luminol reaction, supporting the above hypothesis. However, the chemiluminescence was enhanced when blood was treated with luminol mixed with an 8 M urea solution, although the fact that the time for urea to denature hemoglobin was shorter compared to when blood was pretreated with urea and followed by luminol. In addition, the chemiluminescence was enhanced when a transition metal without hemoglobin was reacted with urea-containing luminol. Based on these results, it is anticipated that urea not only denatures hemoglobin but also plays a role in the luminol-hydrogen peroxide reaction.

요약: Urea는 혈액의 hemoglobin을 변성시켜 효소 활성 자리를 노출시킴으로써 혈액-luminol 반응의 화학발광 세기를 향상시킨다는 가설을 검증하고자 하였다. 이를 위해 혈액을 urea로 전처리한 경우 urea의 농도가 더 높아지거나 전처리 시간이 늘어날수록 혈액-luminol 반응의 화학발광 세기가 증가하였고 이는 기존의 가설과 부합되는 결과였다. 하지만 8 M urea용액을 미리 혼합하여 제조한 luminol로 혈액을 처리하면 혈액을 urea로 미리 전처리한 경우에 비해 urea가 hemoglobin을 변성시키는 시간이 짧아짐에도 화학발광 세기가 오히려 증가하는 현상이 나타났다. 또한 hemoglobin이 없는 전이금속을 urea가 포함된 luminol과 반응시켰을 때 화학발광이 강해지는 현상이 관찰되었다. 이러한 점으로 미루어 볼 때 urea는 hemoglobin을 변성시킬 뿐만 아니라 luminol-hydrogen peroxide 반응에도 관여하는 것으로 예상된다.

Key words: luminol, urea, denaturation, hemoglobin

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)41-530-4758 Fax : +82-(0)41-530-4755

E-mail : swhong524@naver.com

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.

1. 서 론

혈흔은 범죄수사에 이용되는 대단히 중요한 증거 중 하나이다. 감식 요원들은 범죄현장에 남아있는 혈흔이 미량이어서 육안으로 식별되지 않는 경우에 혈흔 증강 시약을 사용하여 혈흔을 증강한다.¹ 혈흔을 증강하는 시약으로는 아미노산을 검출하는 시약(ninhydrin, 1,8-diazafluoren-9-one 등),^{2,3} 혈액에 포함된 단백질을 검출하는 시약(amido black, acid yellow 7 등)^{4,6} 및 hemoglobin을 검출하는 시약(leuco crystal violet, luminol 등)⁷⁻⁹이 알려져 있다. Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione)은 혈액 속 hemoglobin에 포함된 heme과 반응하여 화학발광을 하는 시약¹⁰으로서 어두운 곳에서 사용해야 하고 화학발광을 관찰할 수 있는 시간이 짧다는 단점^{11,12}이 있지만 다른 혈흔 검출 시약에 비해 감도가 뛰어나다는 장점이 있어서 과학수사 현장에서 널리 사용되어져 왔다.¹³⁻¹⁵ Luminol의 감도가 아무리 뛰어나다고 하더라도 범인이 현장을 청소하는 행위 등을 하여 혈액 양이 지나치게 적은 경우에는 luminol 반응에 의한 화학발광이 나타나지 않을 수 있기¹⁶⁻¹⁸ 때문에 법과학자들은 luminol의 화학발광을 향상시키기 위해 여러 방법을 연구해 왔다.¹⁹⁻²¹

혈흔 검출용 luminol을 조제하는 방법으로는 Weber가 제안한 방법²²과 Grodsky가 제안한 방법²³이 알려져 있다. Stoica et al.은 혈액을 8 M urea로 전처리한 후 Weber가 제안한 조성의 luminol시약을 분주하여 화학발광을 관찰한 결과 8 M urea를 전처리하지 않은 실험군보다 화학발광의 세기가 증가하는 현상을 발견하였다.²⁴ 단백질 변성제 중 urea는 단백질의 3차원 구조를 ‘풀어’주는 chaotropic agent로 분류된다. 이러한 chaotropic agent는 용액 내의 수소결합을 불안정하게 만들어 단백질을 구성하는 아미노산의 residue 사이의 비공유 결합을 방해한다. 그 결과 단백질의 소수성 부분이 용액에 노출되게 하여 단백질의 3차원 구조의 변화를 유도하는 것으로 알려져 있다.²⁵⁻²⁸ Stoica et al.은 이러한 사실에 근거한 분자 동역학 시뮬레이션 (molecular dynamics simulation)을 통해 8 M의 urea가 hemoglobin을 변성시켜 효소 활성 자리를 노출시켰고 그로 인해 luminol 분자가 hemoglobin의 효소 활성 자리에 더 쉽게 접근할 수 있었기 때문에 화학발광의 세기가 증가하는 현상이 나타났다고 설명하였다.²⁴

이처럼 urea를 이용해 혈액을 변성시키면 luminol의 화학발광의 세기를 향상시킬 수 있지만 이 방법을 사용하려면 혈액을 먼저 8 M urea로 20분간 전처리한

후 luminol을 사용해야 하는 번거로움이 있다. 따라서 저자는 luminol시약을 조제할 때 미리 urea를 첨가하여 이런 번거로움 없이 혈액을 높은 화학발광 세기로 증강할 수 있는 luminol시약을 조제하고자 본 연구를 시작하게 되었다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 재료 및 기기

혈액은 defibrinated sheep blood (Carolina Biological Supply Company, USA)을 구매하여 냉장 보관하며 사용하였다. 구매한 혈액이 실험실에 도착한 지 7일 내 모든 실험을 진행하였다. 혈액은 사용하기 전 15분간 교반하였다.

Luminol과 iron (III) chloride hexahydrate는 대정화금(Korea) 제품을, urea, copper (II) perchlorate hexahydrate는 Sigma-Aldrich (USA) 제품을, cobalt (II) chloride hexahydrate는 Milipore (USA) 제품을, iron (II) chloride는 Alfa Aesar (USA) 제품을 사용하였다.

6 mm 여과지는 Advantec (Japan) 제품을 사용하였고, DSLR 카메라는 Nikon D5300 (Japan)을, 접사렌즈는 Nikon AF-S Micro NIKKOR 105 mm (Japan)를 사용하였다. Luminol의 화학발광 세기는 ImageJ software (National Institutes of Health and laboratory for Optical and Computational Instrumentation, USA)로 측정하였다. 그리고 카메라로 촬영한 동영상 파일을 ImageJ에 import하기 위해 FFmpeg plugin을 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 혈액 검체 준비

6 mm 여과지 위에 생리식염수로 1/2000, 1/4000, 1/8000로 희석한 혈액을 20 μ L씩 분주하여 하루 동안 실험실 조건에서 건조하였다.

2.2.2. 시약 제조

Weber가 제안한 protocol²²에 따라 luminol시약을 제조하였다. 8 g의 sodium hydroxide를 500 mL 탈이온수에 녹여 stock solution A를 제조하였고, 10 mL의 30% hydrogen peroxide를 490 mL의 탈이온수와 섞어서 stock solution B를 제조하였다. 그리고 0.354 g의 luminol을 62.5 mL의 stock solution A에 녹여 탈이온수로 500 mL까지 용량을 맞추었다. 각 stock solution을 탈이온수에 각각 10% 농도로 섞어서 luminol 작업용액을 제조하였다. 제조한 luminol 작업용액은 제

조 후 3시간 이내에 사용하였다.

2.2.3. 촬영조건

DSLR 카메라를 촬영대에 장착하여 20 cm 높이에

위치시킨 후, 동영상의 경우 ISO 3200, 초당 60프레임, F/2.8 조건으로 촬영하였다. 정지 사진은 ISO 400, 셔터 스피드는 30초, F/2.8 조건으로 촬영하였다. 모든 촬영은 완전한 암실에서 이루어졌다.

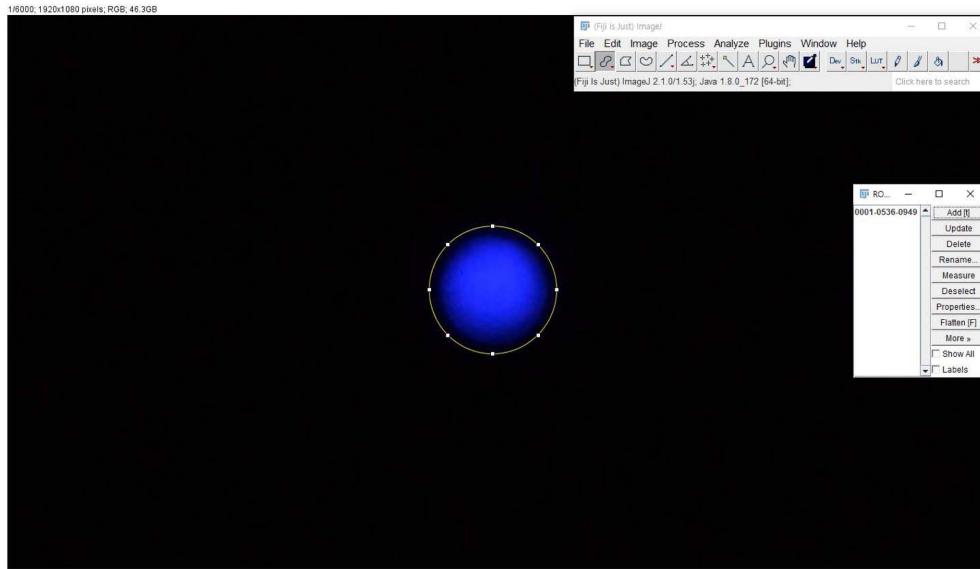


Fig. 1. An example of measuring the luminosity by importing a video file into ImageJ and then setting the luminescent region as an ROI (yellow circle).

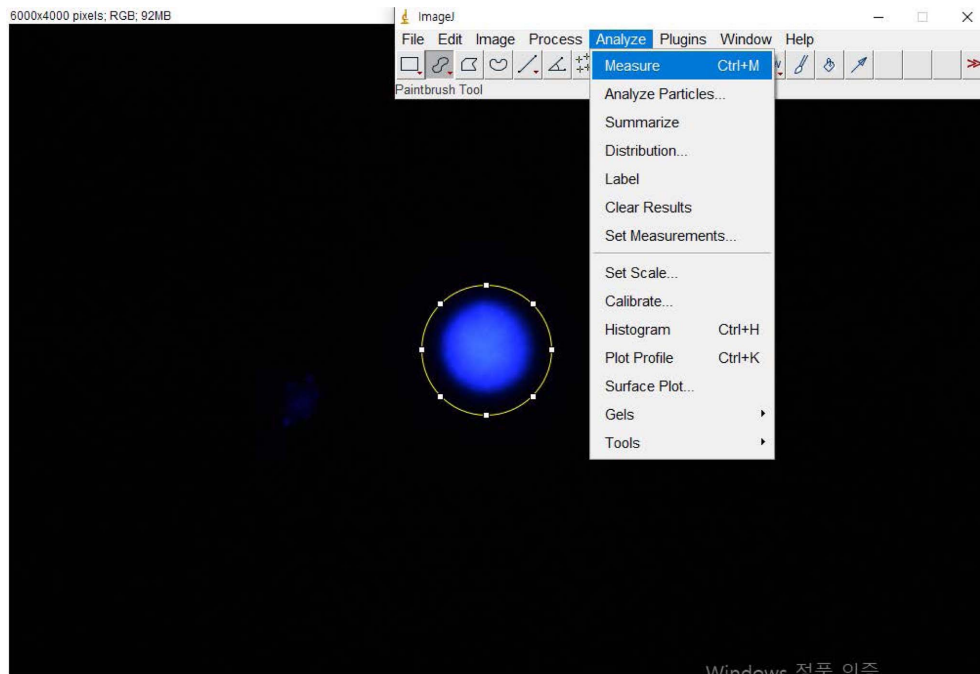


Fig. 2. An example of measuring luminosity in a still Image opened with ImageJ and setting the luminescent region as a ROI (Yellow Circle).

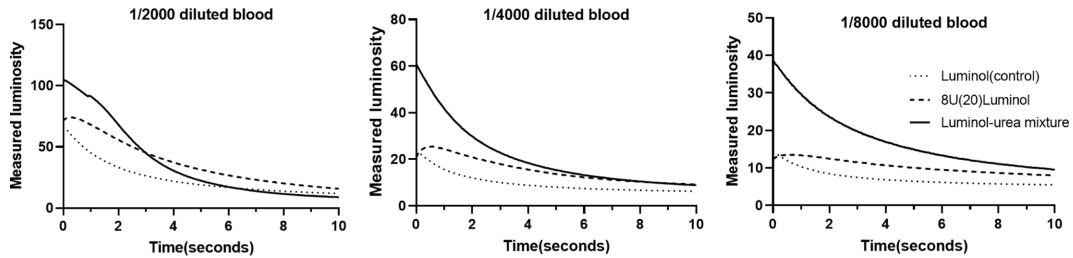


Fig. 3. Time-course of changes in luminosities between diluted blood (1/2000, 1/4000, 1/8000) enhanced with luminol pre-treated with urea (8U(20)Luminol) and diluted blood enhanced with luminol-urea mixture.

2.2.4. 측정방법

혈액과 luminol의 반응은 동영상으로, 전이금속과 luminol의 반응은 정지사진으로 촬영하였다. 동영상의 경우, ImageJ에 FFmpeg plugin (FFmpeg team)을 추가로 설치하여 카메라로 촬영한 동영상을 ImageJ로 import 하였고, Fig. 1에서 보인 것처럼 프레임 상의 화학발광 부분을 모두 포함하는 250 pixel brush 크기로 ROI (region of interest)를 설정한 후, ROI창에서 “multi measure”기능을 사용하여 화학발광 세기를 측정하였다. 정지사진의 경우 Fig. 2에서 보인 것처럼 프레임 상의 화학발광 부분을 모두 포함하는 800 pixel brush 크기의 ROI를 설정한 후, ImageJ software에 내장된 “Analyze”탭의 “Measure”기능을 사용하여 luminol 반응의 화학발광 세기를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 혈액을 8 M urea로 처리하는 방법에 따른 luminol 화학발광 비교

Stoica *et al.*은 8 M urea로 혈액을 전처리한 후 luminol을 분주하였을 때 화학발광 세기가 증가하는 현상을 관찰하였다. 저자는, luminol을 제조할 때 urea를 미리 혼합하면 혈액을 urea로 전처리하는 경우와 비슷한 세기의 혈액-luminol 반응의 화학발광을 얻으면서 혈액을 urea로 전처리하는 과정을 간소화할 수 있을 것이라고 기대하였다.

이를 확인하기 위해 luminol과 8 M urea를 1:1 부피비로 미리 혼합하여 luminol-urea mixture를 만든 후, 이 mixture 40 µL를 혈액에 분주하였다(이 mixture는 제조 후 30분 이내에 사용하였다). 또한, 8 M urea 20 µL를 혈액에 분주하고 20분간 방치한 뒤 luminol 20 µL를 분주하였다(8U(20)Luminol). 이후 표현에서 U 앞의 숫자는 분주한 urea의 농도를, 괄호 안의 숫자는 urea로 처리하기 전의 대기시간(minute)을 의미한다.

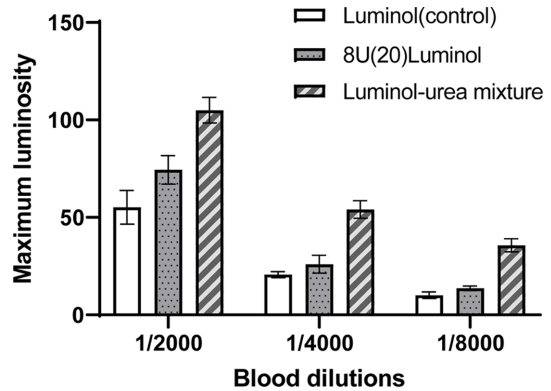


Fig. 4. Comparison of the maximum chemiluminescence values shown in Fig. 3.

대조군으로는 혈액에 luminol 20 µL만을 분주한 것을 사용하였다. 이렇게 다양한 방법으로 혈액과 luminol을 반응시킨 후 혈액-luminol 화학발광 세기의 변화를 동영상으로 촬영한 후, 2.2.4항에 나타난 방법에 따라 시간 경과에 따른 luminol의 화학발광 세기의 변화를 관찰하였다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

Fig. 3은 시간경과에 따른 화학발광 세기의 평균값을 보인 결과로서 혈액의 전처리 상태에 상관없이 luminol을 분주한 직후 혈액-luminol 반응의 화학발광 세기는 최고 값에 도달한 후 시간이 지남에 따라 빠르게 감소한다는 것을 알 수 있다.

Fig. 4는 Fig. 3에 보인 화학발광 세기의 측정값 중에서 최고 값을 추출하여 나타낸 것이다. ‘luminol-urea mixture’에 포함된 urea의 농도는 4 M임에도 불구하고 그림을 보면 ‘luminol-urea mixture’에서 관찰되는 화학발광 세기의 최고 값은 ‘8U(20)Luminol’ 혹은 ‘luminol(control)’에서보다 높다는 것을 알 수 있다. 이에 대해서는 3.3항에서 설명한다.

3.2. Urea 농도 및 전처리 시간이 혈액-luminol 화학발광에 미치는 영향

Simko *et al.*은 혈액과 접촉하는 urea의 농도 및 접촉시간이 증가할수록 hemoglobin의 변성도가 높아진다고 발표한 바 있으나,²⁴ urea에 의한 hemoglobin의 변성도에 따른 혈액-luminol 반응의 화학발광 세기의 변화에 대해서는 저자가 아는 한 연구된 바가 없다. 따라서 혈액을 전처리하는 urea의 농도 및 전처리 시간을 변화시키는 방법으로 hemoglobin의 변성도를 다르게 하여 혈액-luminol 반응의 화학발광 세기의 변화를 관찰하였다.

3.2.1. Urea 농도의 영향

1/2000, 1/4000, 1/8000로 희석한 혈액에 20 μ L의 8 M, 6 M, 4 M, 2 M 및 0 M urea를 분주하고, 20분 동안 방치한 후, luminol 20 μ L를 분주하고, 그 때의 화학발광을 동영상으로 촬영한 후, 동영상에 나타난 화학발광을 측정하였다. 대조군은 혈액에 luminol만을 분주한 것을 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복하였다.

Fig. 5는 그 결과 중 1/4000로 희석한 혈액에서 관찰한 결과를 보인 것이다. 이 결과를 보면 대조군은 luminol을 분주하는 즉시 최고 화학발광 값을 보인 것을 알 수 있다. 반면, urea로 전처리한 혈액은 약 1초 미만의 시간이 경과한 후에 화학발광 세기가 최고 값을 보이고, 특히 0 M urea(탈이온수)로 전처리한 0U(20) Luminol에서도 이런 현상이 나타났다. 1/2000 및 1/8000로 희석한 혈액에서도 동일한 변화가 나타났다(결

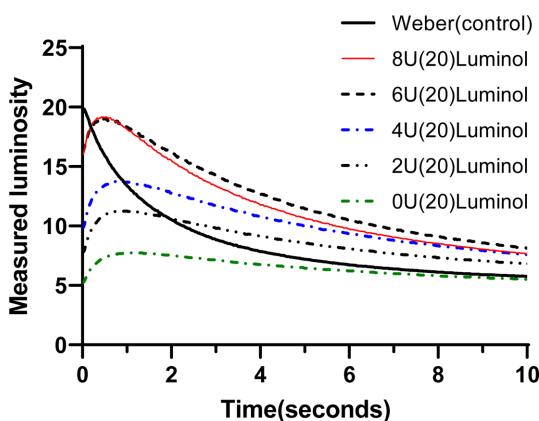


Fig. 5. Time-course of changes in luminosities in the blood-luminol reaction with respect to the reaction time elapsed when diluted at 1/4000 and pre-treated with various concentrations of urea, followed by luminol addition.

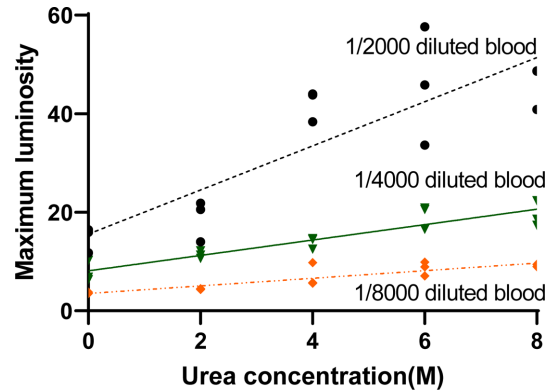


Fig. 6. Maximum luminosity values in the blood-luminol reaction during 10 seconds reaction time with respect to changes in concentration of urea for pre-treating blood.

과는 보이지 않음). Urea로 혈액을 20분동안 전처리하여 hemoglobin의 변성도가 최고에 달해 있었음에도 불구하고 이런 시간지연 현상이 나타나는 현상은 Stoica *et al.*의 가설로는 설명되지 않는다. 이에 대해서는 3.4항에서 다시 논의하겠다.

Fig. 6은 희석배율이 다양한 혈액을 0~8 M urea로 20분 동안 전처리했을 때, 혈액-luminol 반응의 화학발광 세기의 최고 값의 변화를 보인 것으로 urea의 농도와 화학발광 세기의 최고 값의 상관관계를 가짐을 볼 수 있다.

3.2.2. Urea 전처리 시간의 영향

Stoica *et al.*의 연구에서 사용한 urea의 농도는 8 M이었기²⁰ 때문에 혈액을 전처리하는 urea의 농도는 8 M로 고정하였다.

1/2000, 1/4000, 1/8000로 희석한 혈액에 8 M urea 20 μ L를 분주하고 20분에서 0분까지 2분간격으로 전처리 시간을 다르게 한 후 luminol시약을 20 μ L씩 분주하고, 그 때 나타나는 화학발광을 동영상으로 촬영한 후, 동영상에 나타난 화학발광 세기를 측정하였다. 실험은 3회 반복하였다.

Fig. 7은 1/4000로 희석한 혈액을 8 M urea로 시간을 달리 하여 전처리했을 때의 혈액-luminol 반응의 최고 화학발광 값의 변화를 보인 것이다. 이 결과를 보면 Fig. 5에서 나타난 것과 같이 대조군에서는 luminol을 분주하는 즉시 화학발광 세기가 최고 값에 도달하는 반면 urea로 전처리하면 약 1초 미만의 시간이 경과한 후에 최고 값에 도달하는 것을 볼 수 있다.

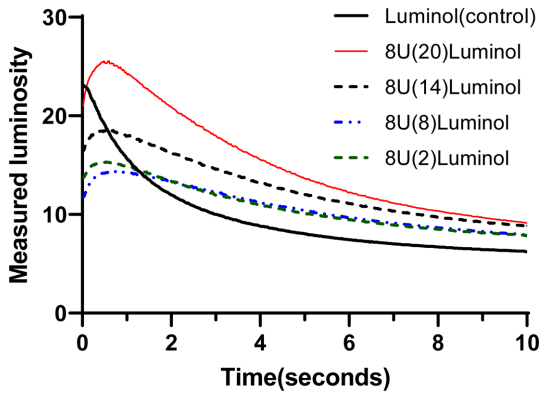


Fig. 7. Time-course of changes in luminosities in the blood-Luminol reaction with respect to the reaction time elapsed, when diluted at 1/4000 and pre-treated with 8 M Urea for various pre-treatment time, followed by luminol addition.

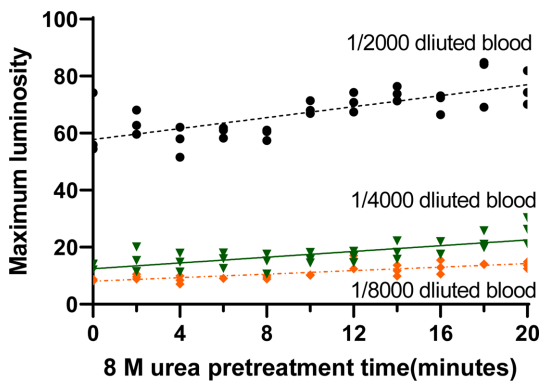


Fig. 8. Maximum luminosity values in the blood-luminol reaction with respect to the blood pre-treatment time(minutes) with urea.

1/2000 및 1/8000로 희석한 혈액에서도 동일한 변화를 관찰할 수 있었다(결과는 보이지 않음).

Fig. 8은 희석배율이 다양한 혈액을 8 M urea로 전처리한 시간을 달리했을 때 혈액-luminol 반응의 화학발광 세기의 최고 값의 변화를 보인 것으로서 그림을 보면 혈액을 urea로 전처리하는 시간과 혈액-luminol 화학발광 세기의 최고 값은 양의 상관관계가 있는 것을 관찰할 수 있다.

3.3. Urea의 역할에 대한 검증

Stoica *et al.*의 주장대로라면 혈액을 20분동안 8 M urea로 전처리하면 luminol-urea mixture를 바로 분주한 것보다 hemoglobin의 변성도가 더 높기 때문에,^{20,29} 혈액-luminol 반응 화학발광 세기가 더 높게 나타나야

한다. 그러나 본 실험을 통해 Stoica *et al.*의 주장으로는 설명되지 않는 두 현상을 발견할 수 있었다.

8 M urea로 전처리한 경우보다 luminol-urea mixture를 직접 분주한 경우의 화학발광 세기가 더 강하게 나타났음. 더구나 혈액을 전처리하는 urea의 농도는 혈액-luminol 반응의 화학발광 세기와 양의 상관관계가 있는데 luminol-urea mixture에 포함된 urea의 농도는 4 M에 불과함(Fig. 4).

Urea로 전처리한 혈액에 luminol을 분주하면 약간의 시간지연이 있고 난 뒤 최고 화학발광 세기를 나타냄(Fig. 5 및 Fig. 7).

이런 점을 볼 때 urea를 첨가했을 경우 혈액-luminol 반응의 화학발광 세기가 변하는 현상은 hemoglobin의 변성 이외의 다른 요인에 의해서도 나타났을 가능성이 있다고 여겨지며, 이를 검증할 필요가 있다.

Luminol은 hemoglobin뿐 아니라 일부 전이금속과도 반응하여 화학발광을 일으킬 수 있다고 알려져 있고³⁰⁻³³ 전이 금속은 hemoglobin과 달리 urea에 의해 변성되는 물질이 아니므로 혈액 대신 전이금속을 사용하면 Stoica *et al.*의 가설을 검증할 수 있을 것이라고 예상했다. 그래서 전이금속인 cobalt (II), copper (II), iron (II), iron (III) 0.01 M 수용액을 20 μ L씩을 여과지에 각각 분주하고 24시간 건조하였다. 여기에 8 M urea 20 μ L를 분주하고 20분간 방치한 다음 luminol을 분주하거나 luminol-urea mixture 20 μ L를 분주하였다. 또한 Weber가 제시한 luminol시약의 조성에서 탈이온수 대신 8 M urea를 사용한 luminol 용액(8 M urea based luminol)을 만든 후 이 시약 20 μ L를 분주하였다. 전이금속-luminol 반응은 혈액-luminol 반응에 비해 화학발광 세기가 약해서 Nikon D5300 카메라의 동영상 촬영 기능으로는 제대로 촬영되지 않았다. 따라서 각 시약을 분주한 직후 카메라의 셔터를 열어 정지 사진을 촬영한 후 ImageJ로 화학발광 세기를 측정했다. 대조군으로는 전이 금속에 luminol 20 μ L만을 분주한 것을 사용하였다. 실험은 3회 반복 시행하였고 그 결과를 Fig. 9에 나타냈다.

Fig. 9를 보면, 혈액 대신 전이금속을 사용하면 luminol-urea mixture에 의한 화학발광 세기는 urea로 전처리한 경우인 8U(20)Luminol과 비슷하거나 오히려 낮게 나타난 반면, 8 M urea based luminol로 처리한 것의 화학발광이 가장 세게 나타난 것을 알 수 있다. 전이금속은 hemoglobin과 달리 urea에 의해 변성되지 않는 물질임에도 불구하고 이렇게 urea로 전처리하는 방법에 따라 화학발광의 세기가 다르게 나타난다는

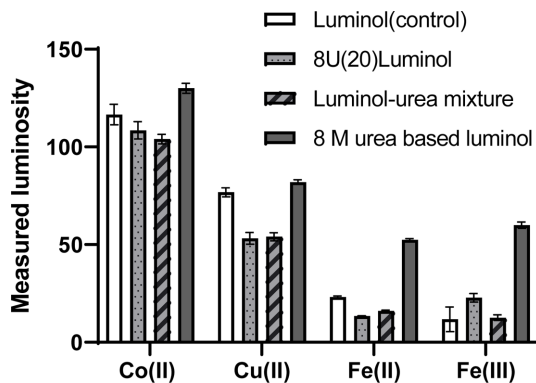


Fig. 9. Comparisons of luminosities when 8U(20)Luminol (8 M urea pretreated followed by luminol addition.), luminol-urea mixture, and 8 M urea-based luminol are added to transition metals cobalt (II), copper (II), iron (II), and iron (III).

것은 urea가 hemoglobin을 변성시켜서 화학발광 세기의 변화를 유발한다는 Stoica *et al.*의 가설로는 설명되지 않는다. Weber protocol에 따라 luminol을 조제할 때 hydrogen peroxide를 첨가하며, hemoglobin에 포함된 heme은 luminol-hydrogen peroxide 반응의 촉매로 작용하여 결과적으로 혈액-luminol 반응의 화학발광을 나타낸다고 알려져 있다.¹⁰ Urea는 luminol-hydrogen peroxide 반응에도 관여하는 것으로 추정되며 이에 대해서는 별도의 연구가 필요하다고 생각된다.

4. 결 론

이번 연구에서 urea에 의한 hemoglobin 변성도가 증가함에 따라 luminol의 화학발광을 증가시키는 것을 관찰하였고 8 M urea는 hemoglobin 변성을 유도하여 luminol의 화학발광 세기를 증가시킨다는 Stoica *et al.*의 가설을 다시 입증하였다. 하지만 urea가 포함된 4 M urea 농도의 luminol시약은 urea 농도가 8 M에 미치지 못하였고 혈액과의 접촉시간이 짧음에도 불구하고 8 M urea를 전처리하는 방식보다 더 강한 혈액-luminol반응의 화학발광 세기를 관찰할 수 있었다. 또한, 8 M urea 농도의 luminol시약은 urea를 포함하지 않은 luminol보다 더 강한 전이금속-luminol반응의 화학발광 세기를 보여주었다. 이로 미루어 보아 urea가 luminol시약에 미리 섞인 경우에는 luminol-hydrogen peroxide 반응자체에 영향을 주는 기작이 있을 수 있음을 추측할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교의 연구비 지원으로 수행되었음.

References

1. H. C. Lee, T. Palmbach, and M. T. Miller, 'Henry Lee's crime scene handbook', Academic, San Diego, Calif., 2001.
2. L. C. Bossers, C. Roux, M. Bell, and A. M. McDonagh, *Forensic Sci. Int.*, **210**(1-3), 1-11(2011). <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.04.006>
3. K. J. Farrugia, H. Bandey, K. Savage, and N. Nic-Daeid, *Sci. Justice*, **53**(1), 8-13(2013). <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2012.08.003>
4. V. G. Sears and T. M. Prizeman, *J. Forensic Identif.*, **50**(5), 470-480 (2000).
5. V. G. Sears, C. P. G. Butcher, and L. A. Fitzgerald, *J. Forensic Identif.*, **55**(6), 741-763 (2005).
6. K. J. Farrugia, K. A. Savage, H. Bandey, and N. Nic Daeid, *Sci. Justice*, **51**(3), 99-109 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2010.11.001>
7. K. J. Farrugia, K. A. Savage, H. Bandey, T. Ciuksza, and N. Nic Daeid, *Sci. Justice*, **51**(3), 110-121 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2010.11.002>
8. W. J. Bodziak, *Forensic Sci Int.*, **82**(1), 45-52 (1996). [http://doi.org/10.1016/0379-0738\(96\)01965-2](http://doi.org/10.1016/0379-0738(96)01965-2)
9. W. J. Bodziak, 'Footwear impression evidence : detection, recovery, and examination/, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, Fla, 1999. <https://doi.org/10.1201/9780203755587>
10. F. Barni, S. J. Lewis, A. Berti, G. M. Miskelly, and G. Lago, *Talanta*, **3**(72), 896-913 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.045>
11. R. M. Gardner, D. Krouskup 'Practical crime scene processing and investigation', 3rd Ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., 2018. <https://doi.org/10.4324/9781315170596>
12. R. A. Zweidinger, L. T. Lytle, and C. G. Pitt, *J. Forensic Sci.*, **18**(4), 296-302 (1973). <https://doi.org/10.1520/JFS10031J>
13. R. E. Gaensslen, F. R. Camp, and National Institute of Justice (U.S.), 'Sourcebook in forensic serology, immunology, and biochemistry. Unit ix, Translations of selected contributions to the original literature of medi-

- colegal examinations of blood and body fluids', U.S. Dept. of Justice, National Institute of Justice, Washington, D.C., 1983.
14. S. H. James, P. E. Kish, T. P. Sutton, 'Principles of blood-stain pattern analysis : theory and practice', CRC, Boca Raton, Fla, 2005. <https://doi.org/10.1201/9781420039467-21>
 15. J. Finnis, J. Lewis, and A. Davidson, *Sci. Justice*, **53**(2), 178-186 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2012.09.001>
 16. J. I. Creamer, T. I. Quickenden, L. B. Crichton, P. Robertson, and R. A. Ruhayel, *Luminescence*, **20**(6), 411-413 (2005). <https://doi.org/10.1002/bio.865>
 17. M. Hofmann, J. Adamec, K. Anslinger, B. Bayer, M. Graw, O. Peschel, and M. M. Schulz, *Int. J. Legal Med.*, **133**(1), 3-16 (2019). <http://doi.org/10.1007/s00414-018-1897-2>
 18. D. Howard, J. Chaseling, and K. Wright, *Forensic Sci. Int.*, **302**, 109885 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.forsci-int.2019.109885>
 19. G. Patel and A. J. Hopwood, *Int. J. Legal Med.*, **4**(127), 723-729 (2012). <http://doi.org/10.1007/s00414-012-0800-9>
 20. B. A. Stoica, S. Bunesco, A. Neamtu, D. Bulgaru-Iliescu, L. Foia, and E. G. Botnariu, *J. Forensic Sci.*, **61**(5), 1331-1336(2016). <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13141>
 21. S. Lim, J.-m. Kim, and S.-K. Lim, *Anal. Sci. Technol.*, **31**(1), 47-56 (2018). <https://doi.org/10.5806/AST.2018.31.1.47>
 22. K. Weber, *Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med.*, **57**(3), 410-423 (1966).
 23. W. Grodsky, K. Wright, and P. L. Kirk, *J. Crim. Law Criminol. Police Sci.*, **42**(1), 95-104 (1951). <https://doi.org/10.2307/1140307>
 24. J. P. Simko, Jr. and W. Kauzmann, *Biochemistry*, **1**, 1005-1017 (1962). <https://doi.org/10.1021/bi00912a010>
 25. A. Wallqvist, D. G. Covell, and D. Thirumalai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2**(120), 427-428 (1998). <https://doi.org/10.1021/ja972053v>
 26. B. J. Bennion and V. Daggett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**(9), 5142-5147 (2003). <https://doi.org/10.1073/pnas.0930122100>
 27. M. Lee and N. F. A. v. d. Vegt, *J. Am. Chem. Soc.*, **15**(128), 4948-4949 (2006). <https://doi.org/10.1021/ja058600r>
 28. L. Hua, R. Zhou, D. Thirumalai, and B. J. Berne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**(44), 16928-16933 (2008). <https://doi.org/10.1073/pnas.0808427105>
 29. J. P. Harrington and L. Keaton, *Int. J. Biochem.*, **25**(5), 661-664 (1993). [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(93\)90350-N](https://doi.org/10.1016/0020-711X(93)90350-N)
 30. K. R and M. H. H., *Angew. Chem.*, **54**(17-18), 213-215 (1941). <https://doi.org/10.1002/ange.19410541703>
 31. W. R. Seitz and D. M. Hercules, *Anal. Chem.*, **13**(44), 2143-2149 (1972). <https://doi.org/10.1021/ac60321a020>
 32. W. R. Seitz and E. A. Rudolf, In 'Chemiluminescence and Bioluminescence', p427-449, Cormier, M.J., Hercules, D.M., Lee, J., Ed., Springer, Boston, MA, 1973. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0638-3_31
 33. L. L. Klopff and T. A. Nieman, *Anal. Chem.*, **55**(7), 1080-1083 (1983). <https://doi.org/10.1021/ac00258a023>

Authors' Positions

Sungwook Hong : Professor
 Youngpyo Bae : Graduate Student