
中国土壤学会团体标准制订项目

《土壤中自由基与活性氧的测定 电子顺磁共振波谱法》

Electron paramagnetic resonance (EPR) as a method for
measuring free radicals and reactive oxygen species generated
by soil system

编 制 说 明

(征求意见稿)

编制工作组

二〇二五年七月

项目名称：土壤中自由基与活性氧的测定 电子顺磁共振波谱法

项目负责单位：中国科学院南京土壤研究所

项目负责人：蒋倩

技术委员会：中国土壤学会团体标准工作管理委员会

联系电话：025-86881167

邮 箱：qjiang@issas.ac.cn

目 录

一、工作简况.....	2
1.1 任务来源.....	2
1.2 制定背景.....	2
1.3 起草过程.....	3
二、标准编制原则、主要内容及其确定依据.....	4
2.1 编制原则.....	4
2.2 主要内容确定依据.....	5
2.3 标准方法确认内容.....	14
2.4 经典案例.....	19
三、方法学验证.....	25
3.1 方法检出限和定量限.....	25
3.2 正确度与精密度.....	26
3.3 误差分析.....	27
3.4 预期经济效益.....	27
四、标准涉及的相关知识产权说明.....	28
五、采用国际标准的程度与水平的简要说明，与现行有关法律法规和强制性标准的关系.....	28
六、重大分歧意见的处理经过和依据.....	28
七、其他应予说明的事项.....	28

一、工作简况

1.1 任务来源

根据《中国土壤学会团体标准管理办法（试行）》规定，经自愿申请、专家评审论证，评定《土壤中自由基与活性氧的测定 电子顺磁共振波谱法》团体标准符合立项要求，中国土壤学会于 2025 年 03 月 25 日准予立项并下达制定工作任务，牵头单位为中国科学院南京土壤研究所。

1.2 制定背景

近年来，研究人员对土壤环境持久性自由基（Environmental Persistent Free Radicals, EPFRs）形成与有机质、金属离子及污染物的相互作用进行了大量的研究并取得进展。比如土壤有机质中的腐殖酸和金属离子等能够与土壤中的含氯农药等有机污染物作用产生多酚类自由基，在土壤腐殖质和类腐殖质中也发现半醌类自由基的存在。这些研究结果表明，EPFRs 是有机污染物环境归趋的重要组成部分，且与土壤无机矿物及过渡金属位点的结合会提高其稳定性和持久性，使其有条件进行长距离、不同环境介质的迁移与转化，可能增大了潜在的环境风险。

据报道，EPFRs 也正在被研究者应用在污染物降解的研究中，其可以激发过硫酸盐产生羟基 $\cdot\text{OH}$ 和硫酸根 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 等自由基，检测这些活性组分可为该修复技术提供直接证据。同样，在土壤的污染与修复、环境的污染与治理、自由基转化与机理等研究领域中，大量研究报道了关于合成催化剂、新型材料、光照、电解等化学或物理方式活化过硫酸盐或矿物等反应体系的进展与成果，这些反应体系产生的活泼自由基 $\cdot\text{OH}$ ， $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ，及 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $^1\text{O}_2$ 等活性氧物质，可被 EPR 自旋捕获技术监测并获得动态转化信息。可见，EPR 检测自由基与活性氧是相关研究的探索与突破不可或缺的技术手段。

电子顺磁共振谱仪（EPR，亦称 ESR）可对土壤 EPFRs 进行直接、无损伤量化检测，也可采用捕获剂（DMPO, TEMP 等）对土壤化学氧化修复反应体系中的活泼自由基 $\cdot\text{OH}$ ， $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ， $\text{O}_2^{\cdot-}$ ， $^1\text{O}_2$ 形成的加合物进行定性与定量。通过对 EPR 图谱进行解析，由 g 因子、超精细分裂可获取土壤污染物类型、磁性粒子性质等信息，由电子自旋浓度可量化自由基与活性氧物质。因此，电子顺磁共振波谱法

测定环境持久性自由基、活泼自由基，以及活性氧物质在土壤环境与污染修复及其机理的研究中起着关键技术支持作用。

目前，国内已编制了关于 EPR (ESR) 波谱法的通则 (JY/T 0579-2020)、辐照食品的鉴定 (GB 31642-2016, NY/T 2211-2012, SN/T 2910.1-2011)、卷烟主流烟气中气相与固相中自由基含量的测定 (DB45/T 1494-2017, DB45/T 1495-2017)，以及纳米技术电子自旋共振 (ESR) 法检测金属氧化物纳米材料产生的活性氧 (ROS) (GB/T 41917-2022, 等同 ISO/TS 18827: 2017) 的相关标准。国外也建立了关于 EPR (ESR) 的通则 (ISO 13304-1)、辐照量的测定，涉及放疗食品中纤维素 (BS EN 1787:2000)、丙氨酸放射量 (ISO/ASTM 51607:2013)、牙齿放射量 (ISO 133304-2) 的标准通则与规范。但尚未见到采用 EPR (ESR) 谱法对土壤中持久性自由基与土壤化学氧化修复中常见的活泼自由基羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)、硫酸根自由基 ($\text{SO}_4^{\cdot-}$)，以及活性氧物质 ROS 超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、单线态氧 ($^1\text{O}_2$) 等的测定标准方法。

本团标旨在标准化分析流程、谱仪参数优化步骤、图谱解析思路，并提供典型案例图谱的参考性资料，从而为数据质量保驾护航。

1.2.1 拟解决的主要问题

立足于前期调研与预实验基础，以土壤化学氧化修复体系实际反应体系为研究案例，通过开展方法的验证与比对实验，本标准拟解决的主要关键技术问题：

(1) 确认固态标准物质自行配置方法，保存方式和保存期限；(2) 确认液态标准溶液的溶剂、保存方式和保存期限；(3) 确认固体与液体标准曲线范围及相关线性系数；(4) 确认主流品牌及多型号谱仪对自由基与活性氧测试的主要参数设置范围及差异性原因分析；(5) 确认关于 EPR 测试土壤化学修复体系中自由基与活性氧典型案例及其相关制备信息和解析信息，并在标准中提供参考性资料附件。通过确认以上标准方法的内容，增强与提升其操作步骤与过程关键技术点的可操作性、指导性、科学性、先进性。

1.3 起草过程

1.3.1 成立标准编制组

2025 年 4 月，项目承担单位（中国科学院南京土壤研究所）组织成立了标

准编制工作组，起草单位主要有 5 家，分别是中国科学院南京土壤研究所、中国科学技术大学、重庆大学、中山大学、南京大学，其具体分工见表 1。

表 1 主要参与单位及分工

单位名称	职责分工
中国科学院南京土壤研究所	主持起草、组织研讨，负责方法验证比对、方案起草、数据处理
中国科学技术大学	参加标准起草、研讨，提出修改建议
重庆大学	参加标准起草、研讨，提出修改建议
中山大学	参加标准起草、研讨，提出修改建议
南京大学	参加标准起草、研讨，提出修改建议

1.3.2 起草及实验阶段

从申请标准制定开始，牵头单位中国科学院南京土壤研究所总览国内外标准方法的差异性，并组织开展方法比对与验证实验，完成标准样品遴选配置和测试条件优化，以自由基与活性氧物质的经典测试案例来验证方法的可靠性，在此基础上撰写团体标准的起草稿。编制组结合方法验证数据与仪器测试条件进行论证商讨，优化部分实验比对方案，不断优化与完善团体标准方法，开展了大量的实验室内方法研究工作，最终完善形成了标准草案。

1.3.3 征求意见阶段

2025 年 4~6 月撰写征求意见稿及方法编制说明，7 月提交至中国土壤学会团体标准工作管理委员会公开征求意见。

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

2.1 编制原则

本标准按照《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1-2020）起草文本，确保标准的规范性。编写制定过程中，立足于分析方法成熟可靠，有广泛的应用基础，同时具备适用性、先进性、科学性、规范性

原则。按照以下三个方面开展工作：首先，充分调研国内外有关自由基与活性氧物质检测方法和查阅大量文献资料，总览方法的异同；其次，通过大量的条件对比验证实验，确认分析方法关键技术适宜性；最后，在标准编制过程中，严格按照《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》（GB/T 27417-2017）进行实验，并考察方法的检测限、定量限，以及重复性。

2.2 主要内容确定依据

2.2.1 固态标准物质 DPPH 的确认

由于市售标准物质的性价比低且种类较少，为了增强本标准方法的普及性、适用性与经济性。方法验证实验中，以常用稳定自由基 DPPH 作为固体标准的研究对象，开展自行配制标准物质的浓度范围、保存期等相关验证比对实验。

（1）溶剂的选用

溴化钾（KBr）是一种化学惰性、抗磁性的立方晶系离子晶体，可作为溶剂分散 DPPH 的粉末，增大 DPPH 自由基分子间的距离，有效减弱未成对电子间的磁偶极-偶极相互作用，为 DPPH 提供均匀稳定的物理环境，是实现 DPPH 标准物质准确的 EPR 测试的理想溶剂。

（2）配置与保存条件的确认

DPPH 是在空气中和室温下比较稳定的自由基，其磨碎并稀释后可作标准样品使用。在实验中，可根据实际需求配置标准浓度。按照计算质量浓度，分别准确称取 DPPH 与 KBr 质量，在玛瑙研钵中一边研磨一边充分混合，至颜色均匀一致（表明已充分混合），再转移至石英管中，封口。

验证实验中，我们分别考察了低、中、高 3 种浓度 10 $\mu\text{g/g}$ 、40 $\mu\text{g/g}$ 、100 $\mu\text{g/g}$ DPPH 在 KBr 中的稳定性。在避光存放于 4℃冰箱的条件下，分别于第 1、4、8、17、25、31 天检测 EPR 信号，其变化趋势见图 1~3。同时，绘制不同保存期 DPPH 的 EPR 信号面积随保存期的变化趋势图（图 4）。由图 1~4 可知，低、中、高含量 DPPH 的 EPR 信号在 31 天内均出现不同程度的降低，且呈现前期降低速度快与后期降低速度放缓的现象，并且低、中含量（10 $\mu\text{g/g}$ 、40 $\mu\text{g/g}$ ）DPPH 的信号衰减显著且迅速，至第 31 天约降至初始值的 33%、34%，而高含量（100

$\mu\text{g/g}$) DPPH 的信号相对稳定,但也仅保持约初始值信号的 61%。实验结果表明,在避光和冷藏条件下, DPPH 在 KBr 溶剂中的稳定性与其浓度紧密相关。与较低浓度的信号变化相比,浓度较高对应 EPR 信号随时间的衰减较缓慢。据此,标准中明确建议,使用 10~100 $\mu\text{g/g}$ 浓度范围 DPPH 需要当日配置并及时使用。

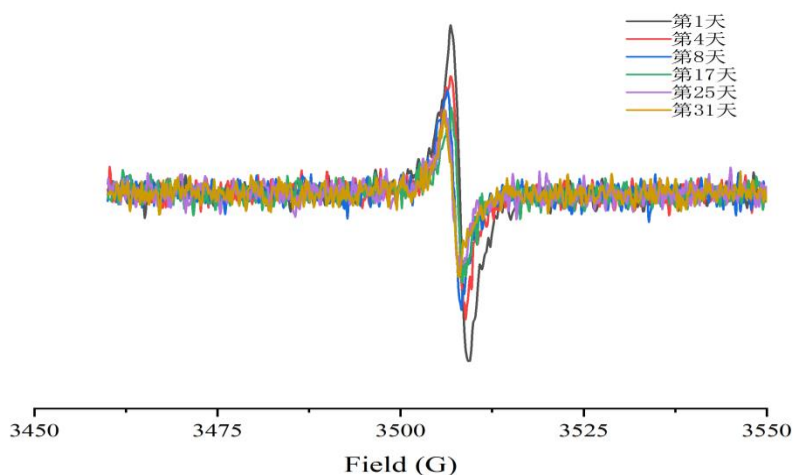


图 1 10 $\mu\text{g/g}$ DPPH 在 KBr 中不同保存期的 EPR 信号

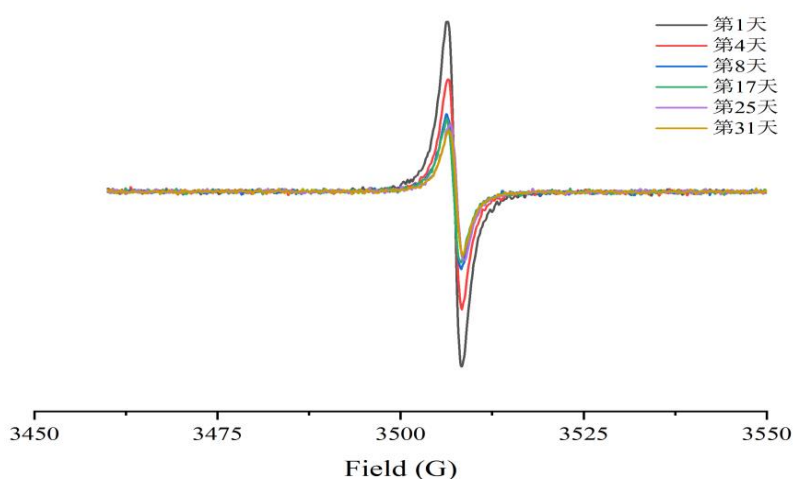


图 2 40 $\mu\text{g/g}$ DPPH 在 KBr 中不同保存期的 EPR 信号

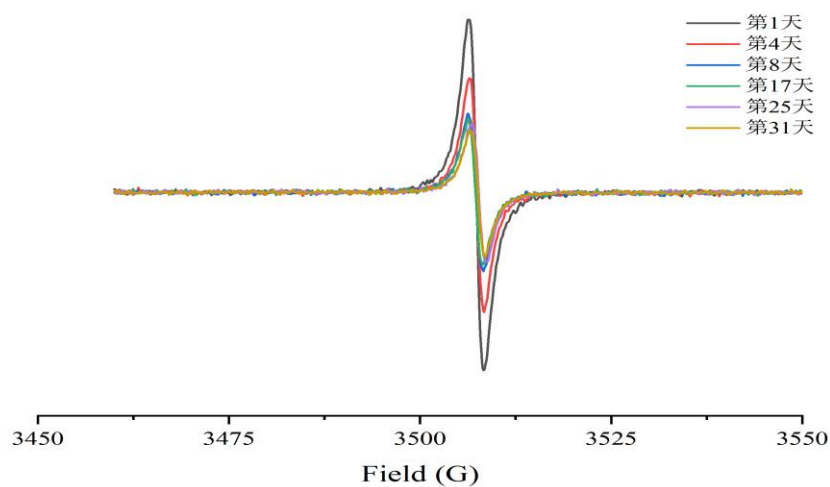


图 3 100 µg/g DPPH 在 KBr 中不同保存期的 EPR 信号

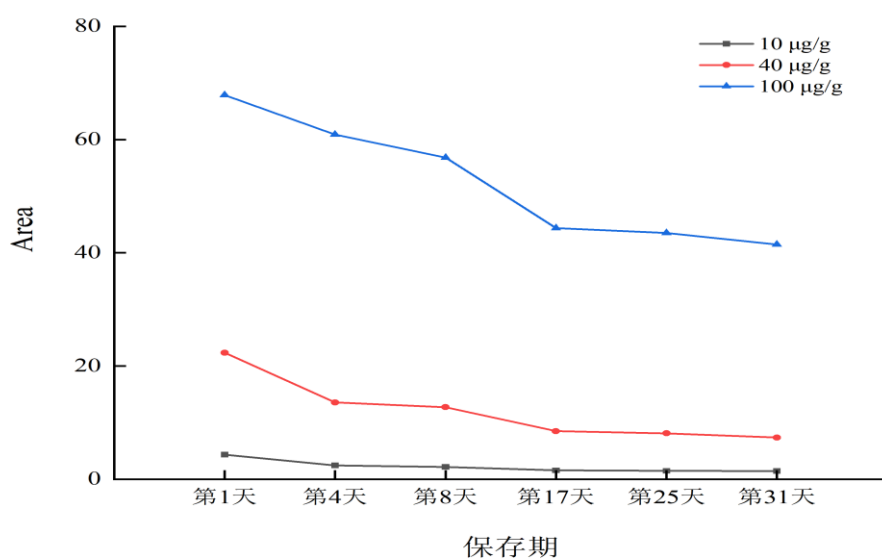


图 4 DPPH 在 KBr 中不同保存期的 EPR 信号变化趋势

(3) 标准曲线范围与线性的确认

由于固体样品 EPR 测试定量实验的需求，标准中需通过方法验证实验对标准曲线的配置与线性进行考察。在确认配置检出限的基础上，以 KBr 为溶剂，配置 0、10、30、50、75、100 µg/g 系列质量浓度的 DPPH，并对其线性进行测试。

据图 5 可知，EPR 图谱面积与系列浓度呈良好的线性关系， R^2 为 0.9992。标准中，确立其相关系数应 ≥ 0.999 。

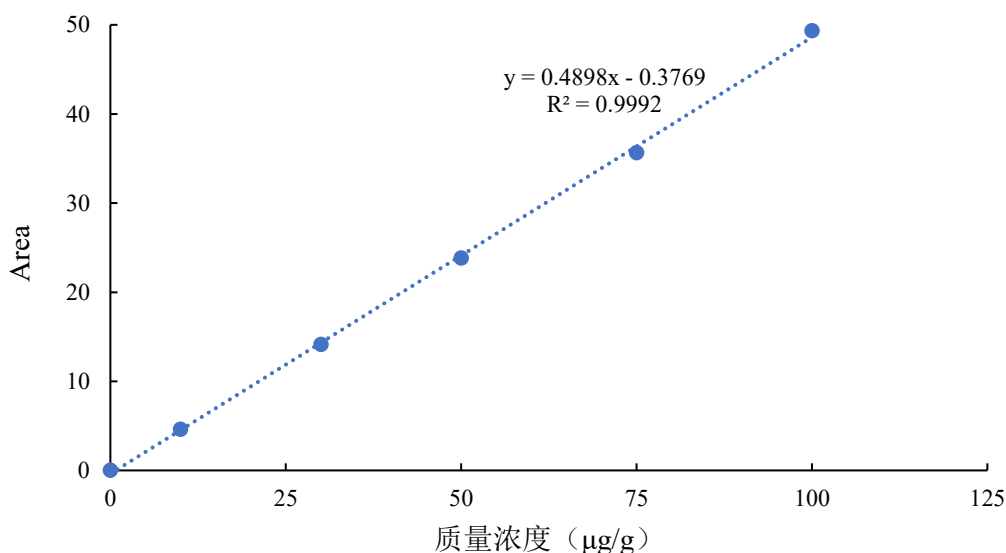


图 5 DPPH 标准系列在 KBr 中 EPR 信号的线性关系

2.2.2 液体标准物质 TEMPO 的确认

由于市售标准物质的性价比低且种类较少，为了增强本标准方法的普及性、适用性与经济性。方法验证实验中，以常用稳定自由基 TEMPO 作为液体标准的研究对象，开展了标准物质的溶剂、浓度范围及保存期限等相关影响因素的验证比对。

(1) 溶剂水与石蜡油的验证比对确认

为了确认溶剂对 TEMPO 的影响，在实验室开展了方法验证实验。以水与石蜡油为溶剂，分别配置 300 nM TEMPO 溶液，然后采用 EPR 谱仪进行测试并解析图谱。据图 6 可知， g 因子分别为 2.0056、2.0061，Hpp 线宽 1.32 G、1.61 G，与 g 因子与 Hpp 线宽波动较小相比，峰面积 Area 存在较大差异，后者 3 倍于前者 (0.26)。因此，标准中建议优先选用石蜡油配制 TEMPO 标准溶液，其 EPR 信号更强且谱仪的灵敏度更高。

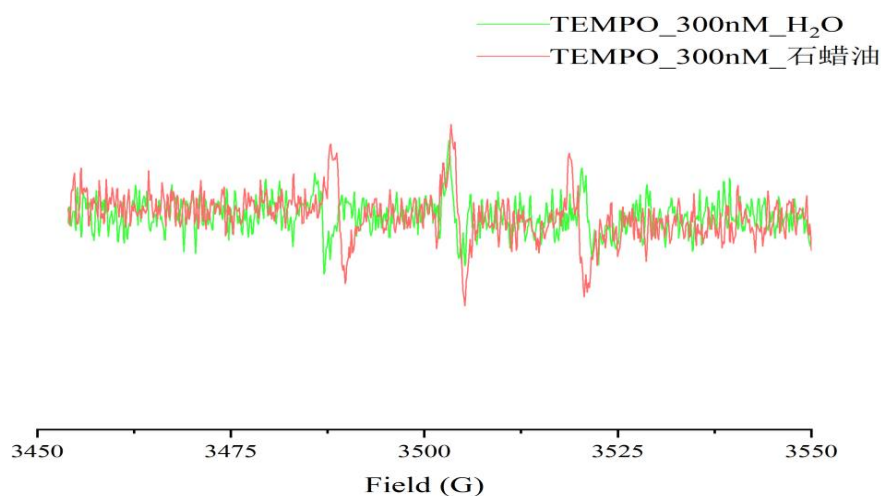


图 6 300 nM TEMPO 在水与石蜡油中的 EPR 图对比

(2) 配置与保存条件的确认

在实验中,可根据实际需求配置 TEMPO 标准系列浓度。按照计算摩尔浓度,准确称取 TEMPO 质量,分别以溶剂(水或石蜡油)溶解,并定容至刻度,摇匀、待测。

由于 TEMPO 对光敏感,需避光保存在棕色瓶,且储存在 4℃ 冰箱中。同样,为了明确保存期限,我们开展两组 3 种不同浓度 1 μM 、10 μM 、20 μM 的 TEMPO 在水与石蜡油中的稳定性实验。6 个标准溶液分别于第 1、5、12、19、26、30 天检测其 EPR 信号,其变化趋势见图 7~9,以及图 10~12。另外计算了保存日期 TEMPO 的 EPR 信号面积的变化趋势(见图 13)。从图 7~13 可知,高、中、低含量的 TEMPO 在水和石蜡油两种溶剂中均为较稳定,除 1 μM 以水为溶剂的 TEMPO 的 EPR 信号面积在第 5 天出现小幅度上升,其后又降至初始值附近的波动外,其余 5 个标准溶液信号均保持在初始值的 96.1%~106.6%。同样也发现,在测试条件相同的条件下,实验中的这些高、中、低含量的 TEMPO 在石蜡油中信号均约 3 倍于水中对应浓度。标准中,建议 1~20 μM 的 TEMPO 溶液在避光与 4℃ 条件下可保存 4 周。

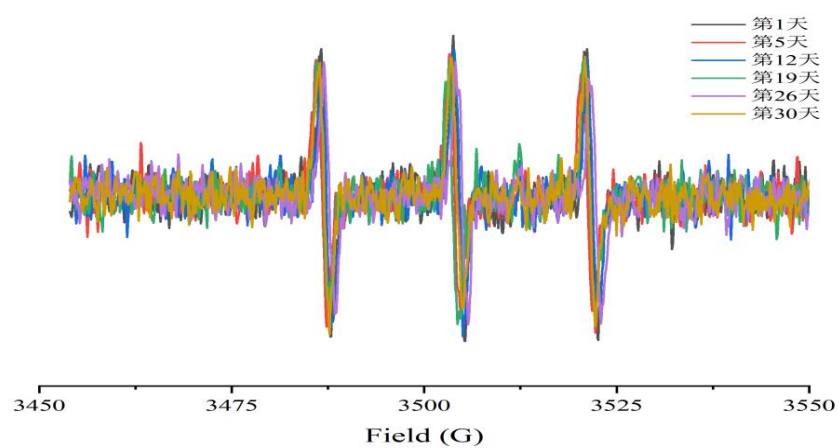


图 7 1 μM TEMPO 在水中不同保存期的 EPR 信号

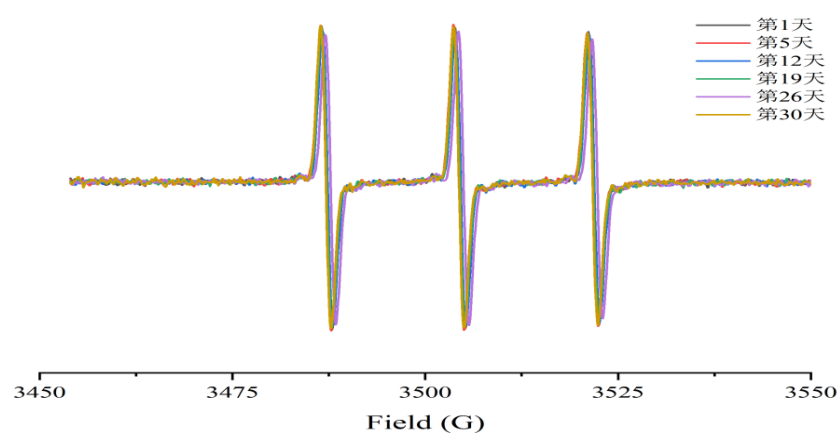


图 8 10 μM TEMPO 在水中不同保存期的 EPR 信号

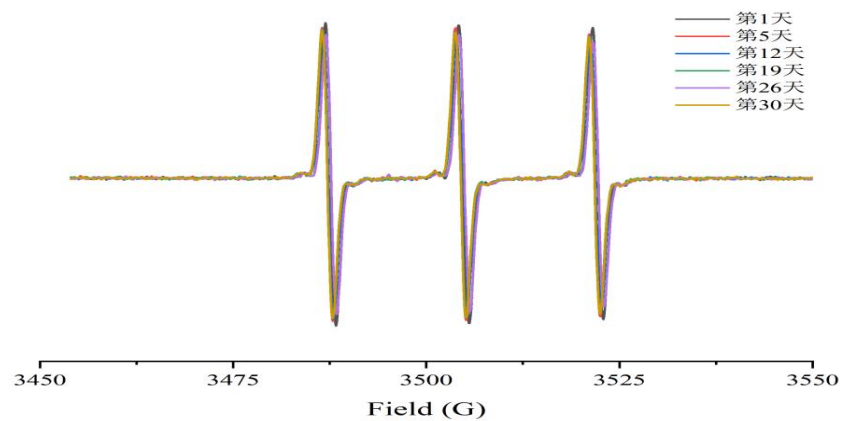


图 9 20 μM TEMPO 在水中不同保存期的 EPR 信号

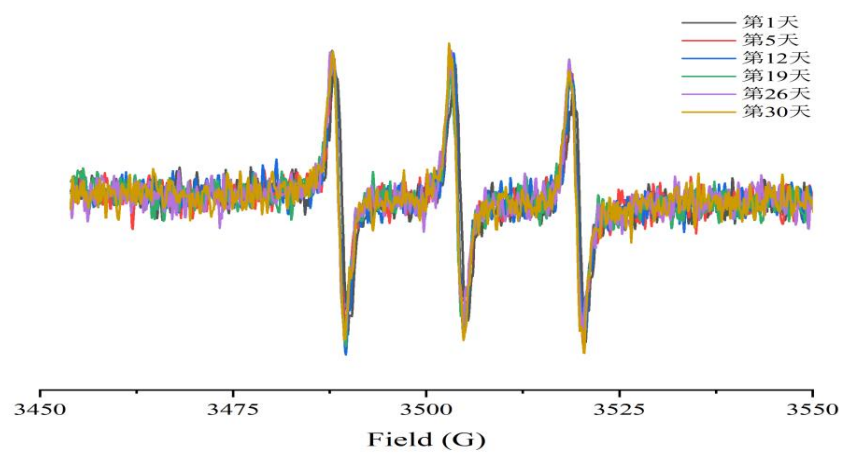


图 10 1 μM TEMPO 在石蜡油中不同保存期的 EPR 信号

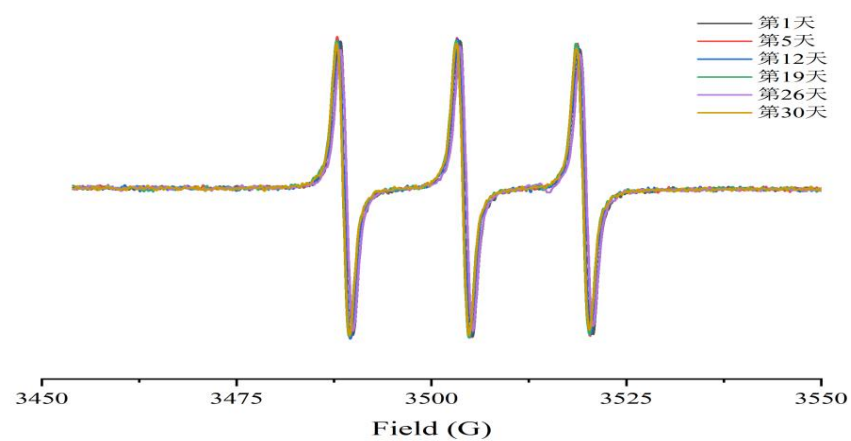


图 11 10 μM TEMPO 在石蜡油中不同保存期的 EPR 信号

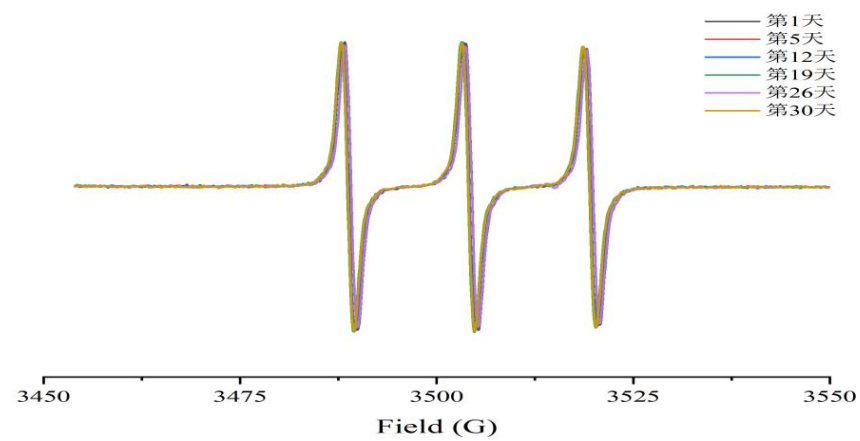


图 12 20 μM TEMPO 在石蜡油中不同保存期的 EPR 信号

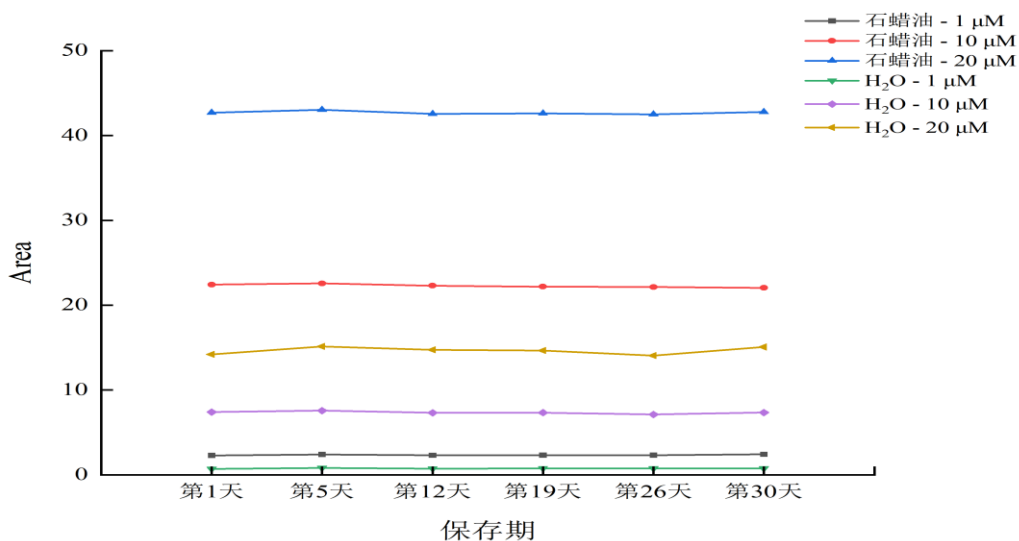


图 13 TEMPO 在水、石蜡油中不同保存期的 EPR 信号变化趋势

(3) 标准曲线范围与线性的确认

为了满足 EPR 测试溶液样品定量实验的需求，标准中需通过方法验证实验对标准曲线的配置与线性进行考察。在初步确认配置检出限的基础上，在水中，配置 0 μM、1 μM、2 μM、5 μM、10 μM、20 μM 系列浓度的 TEMPO，并对其线性进行考察。EPR 信号面积与浓度的线性关系见图 14，其相关系数为 0.9996，呈现良好的线性关系。同样，在石蜡油中，也配置了此系列浓度的标准溶液，其相关系数为 0.9993，线性关系见图 15。因此，在两种溶剂中 TEMPO 溶液线性良好，均可以实现 EPR 的准确定量。但是从峰面积来看，配置在石蜡油中信号面积更大一些。标准中，建议优先选择石蜡油为溶剂，且相关系数 ≥ 0.999 。

2.2.3 EPR 谱仪测试参数的确认

为了明确国产与进口不同主流品牌，甚至同一品牌不同型号 X-波段 EPR 谱仪测试参数的差异性，统计对比了南京土壤研究所、南京大学、重庆大学等多家实验室 5 种设备型号（分别以 A、B、C、D、E 标识）代表性谱仪测试稳定自由基与活泼自由基的常用主要测试参数，稳定自由基主要指环境持久性自由基，活泼自由基主要涉及羟基、活性氧物质等，详见表 2。由表可知，谱仪微波功率通常使用范围从 10 到 23 dB（1.002~20.00 mA），存在一定的差异性，原因在于各实验室调试了最适合的参数来满足单位科研反应体系多样化的需求。设备参数调

制幅度（G）与扫描次数基本都保持默认值 1 G、1 次，实际应用中对于少数弱信号体系可适当调高设置值。应注意，谱仪微波频率与中心磁场存在相关关系，其微波频率在 9.8 GHz 时，基本可设置 3500 G 左右，5 种型号设备值设置类似。但是，若在谐振腔中放入了杜瓦等进样附件，其微波频率降至 9.4 GHz，对应的中心磁场变化为 3350 G 左右。此外，注意进样样品的粗细对微波频率值也有一定的影响。比对试验室图谱扫宽设置为 100 G、150 G、200 G，均可以满足标准中测试持久性自由基、羟基自由基、硫酸根自由基，及活性氧物质图谱分辨

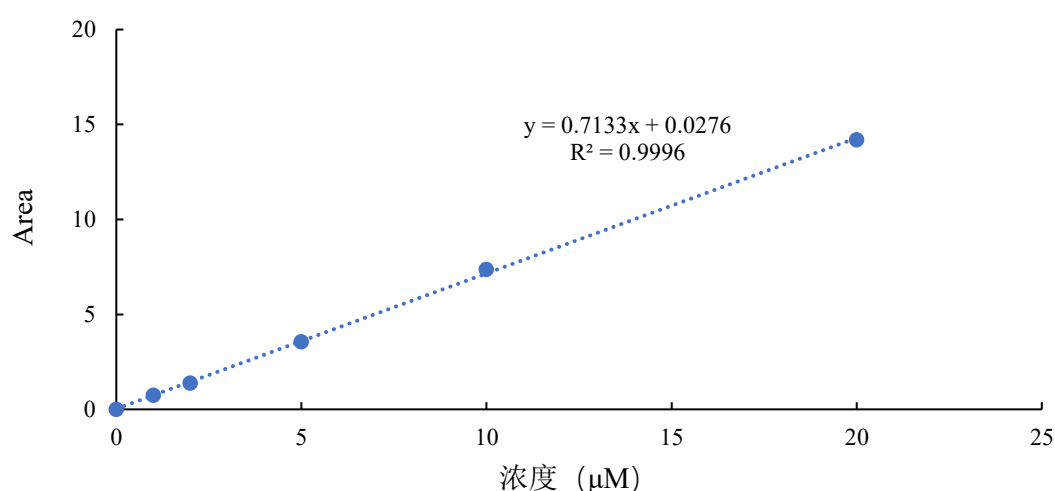


图 14 TEMPO 标准系列在水中 EPR 信号的线性关系

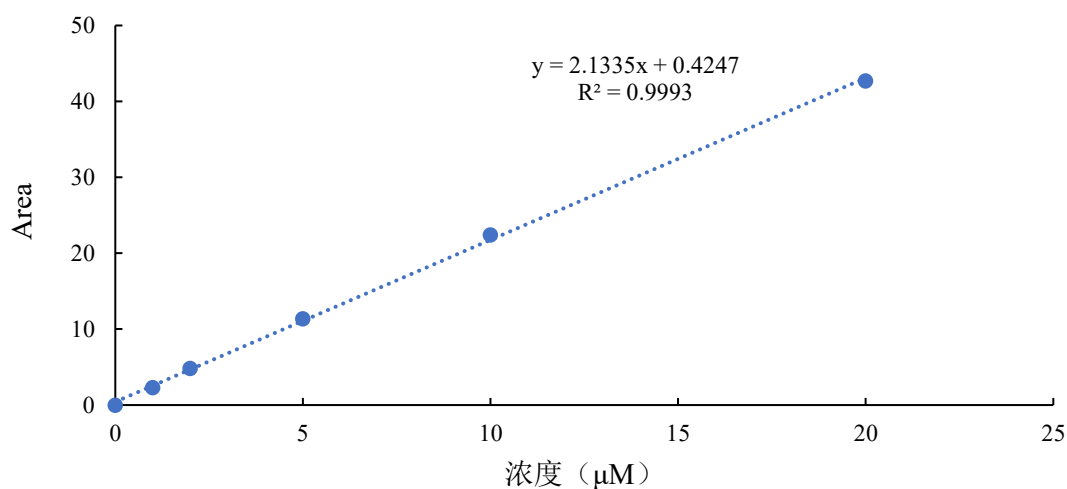


图 15 TEMPO 标准系列在石蜡油中 EPR 信号的线性关系

率与范围的需求。扫描时间在 20~60 s 范围内，尽管对于本标准中谱图无明显影响，但扫描较大范围 EPR 图谱时，建议以某厂商推荐的扫描速度 2 G/s 为佳，以确保图谱 g 值的正确性。据此，验证比对的 5 种设备测试标准中的自由基与活性氧的设置参数存在较小的差异性，但整体上具有一致性。本团标中参考采用设备型号 B 参数设置，即案例设置参数，同时也建议可根据具体体系适当增减参数数值。

表 2 不同电子顺磁共振波谱仪主要设置参数的统计对比

设备	设备型号	自由基类型	主要测试参数							
			微波功率(mW)	微波功率(dB)	调制幅度(G)	设置中心磁场(G)	微波频率(GHz)	扫宽(G)	扫描次数	扫描时间(s)
品牌 1 (国产)	A	稳定	1.002	23	1	3512	9.8	100	1	20
		活泼	1.002	23	1	3500	9.8	100	1	20
品牌 2 (进口)	B	稳定	2.000	20	1	3512	9.8	200	1	40
		活泼	6.325	15	1	3504	9.8	150	1	40
	C	稳定	2.000	20	1	3515	9.8	200	1	30
		活泼	20.00	10	1	3515	9.8	200	1	30
	D	稳定	2.000	20	1	3500	9.8	200	1	30
		活泼	20.00	10	1	3500	9.8	100	1	30
品牌 3 (进口)	E	稳定	1.002	23	1	3500	9.8	100	1	60
		活泼	1.002	23	1	3500	9.8	100	1	60

2.3 标准方法确认内容

2.3.1 检测内容

采用电子顺磁共振波谱仪（X-波段）土对壤中稳定自由基（环境持久性自由基）与土壤化学氧化修复中常见的活泼自由基（羟基自由基、硫酸根自由基），

以及活性氧物质超氧阴离子、单线态氧进行检测。

本标准适用范围：

土壤中环境持久性自由基；

土壤化学氧化修复体系产生的自由基和活性氧：羟基自由基·OH、硫酸根自由基 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 以及超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、单线态氧 $^1\text{O}_2$ 等；

也适用于环境等领域相关的自由基与活性氧的测定。

2.3.2 方法原理

含未配对电子的固态或者液态捕获样品放置至于谐振腔磁场中吸收电磁辐射，当电磁波的频率可激发二个塞曼能级之间的跃迁，并且激发能量与未成对电子的能级之间间距相匹配时，发生低能级跃迁至高能级的磁共振现象。

2.3.4 试剂和材料

(1) 标准与试剂

- A. 二苯基苦基肼基 自由基(DPPH)标准：用于固态样品测试的质量控制。
- B. Mn^{2+} 或 BDPA 标准：从市场购买。用于固态样品扫描测试的质量控制。
- C. 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧自由基(TEMPO)标准：用于溶液样品测试的质量控制。
- D. 捕获剂 DMPO (5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物)贮存液：纯度 $\geq 99\%$ 。用超纯水或 PBS 缓冲溶液溶解 DMPO 至 1M 或 2M, 避光保存于 -20°C 、备用。参考终浓度：20-100 mM。
- E. 捕获剂 TEMP (2,2,6,6-四甲基哌啶)贮存液：纯度 $\geq 99\%$ 。用超纯水或 PBS 缓冲溶液溶解 TEMP 至 1M, 避光保存于 -20°C 、备用。参考终浓度：10~100 mM。选购 TEMP 时，注意其同系物(哌啶、哌啶酮、哌啶醇、哌啶盐酸盐)的溶解性及使用的 pH 范围。
- F. 捕获剂 TPC(2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-3-氨甲酰胺)贮存液：纯度 $\geq 99\%$ 。用超纯水或 PBS 缓冲溶液溶解 TPC 至 1 M, 避光保存于 -20°C 、备用。参考终浓度：10-100 mM。
- G. 硫酸亚铁(FeSO_4)溶液：纯度 $\geq 99.95\%$ 。以超纯水溶解 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，配制成 1 mM，稀释至 0.1 mM，现配现用。参考终浓度：10 μM 。
- H. 双氧水(H_2O_2)溶液：以超纯水稀释 30% H_2O_2 ，配制成 100 mM，稀释至 1 mM，现配现用。参考终浓度：100 μM 。

-
- I. PBS 磷酸盐 7.4 缓冲溶液：取磷酸二氢钾 1.36 g，加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 79 mL，用水稀释至 200 mL 即为 50 mM，亦可从市售购买。参考终浓度：50~100 mM。
- J. 过硫酸钾 ($K_2S_2O_8$) 溶液：纯度 $\geq 99\%$ 。以超纯水稀释，配制成 1 M，稀释至 10 mM，现配现用。参考终浓度：1~10 mM。
- K. 孟加拉玫瑰红 B 溶液：纯度 $\geq 80\%$ 。以超纯水溶解，配制成 10 mM，避光保存。参考终浓度：1 mM。
- L. 甲醇 (CH_3OH) 溶液：HPLC，参考终体积百分数 $\geq 90\%$ 。
- M. 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液：HPLC，参考终体积百分数 $\geq 90\%$ 。

(2) 样品管

样品管应无顺磁信号，并且对微波损耗小，避免对品质因子 Q 产生较大的影响。内径为 3~4 mm 石英或优质玻璃制成的薄壁圆柱形样品管适用于固体样品。液体样品则需吸入内径为 1 mm 毛细管且样品高度为 10~40 mm，再放入石英样品管中。对于损耗较大的液体样品可选用适合的扁平池或其他适宜进样器皿。

2.3.5 仪器与设备

电子顺磁共振波谱仪，具备 X-波段与连续波扫描功能。

2.3.6 样品的制备

(1) 环境持久性自由基 EPFRs 的制备

土壤样品经干燥、研磨、混匀、过筛 (≥ 100 目)。称取约 5~500 mg (0.0001 g)，样品质量应根据样品中顺磁性信号高低而定，并且确保样品高度适宜。样品高度受限于谐振腔最灵敏区域的上限值。以土壤样品为测试案例，其制备信息见 2.4.1。

(2) 羟基自由基 $HO\cdot$ 的产生及制备

土壤中环境持久性自由基、有机质醌自由基、矿物中金属离子等均可介导 Fenton 反应产生羟基自由基 $HO\cdot$ 。常用捕获剂 DMPO 溶液捕获产生的羟基自由基 $HO\cdot$ ，生成寿命较长且较稳定的自旋加合物 DMPO-OH。以芬顿反应体系为测试案例，其制备信息见 2.4.2.1。

(3) 硫酸根自由基 $SO_4^{\cdot-}$ 的产生及制备

活化过硫酸盐体系可产生 $SO_4^{\cdot-}$ 与 $HO\cdot$ ，并被广泛应用在有机污染土壤的修复研究中。活化方法可归为两类：第一类，化学法，加入过渡金属离子、氧化剂、

强碱等试剂后体系发生反应；第二类，物理法，采用紫外光照、热、电解、超声波等物理的技术方式来活化过硫酸盐。以上两种方法均可促使其过氧键断裂，产生氧化性自由基 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 。在水体系中，捕获剂 DMPO 溶液可同时捕获 $\text{HO}^{\bullet}$ 、 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ ，生成寿命较长且较稳定的自旋加合物 DMPO-OH 与 DMPO- $\text{SO}_4^{\bullet-}$ ；若在 DMSO 等试剂中，由于 $\text{HO}^{\bullet}$ 被淬灭，可获得 DMPO- $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 图谱。以光照过硫酸盐反应体系为测试案例，其制备信息见 2.4.2.2。

（4）超氧阴离子 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的产生及制备

合成催化剂、新型材料活化、光照过硫酸盐等反应体系产生主要活性物质为 $\text{O}_2^{\bullet-}$ ，最终实现对土壤污染物的降解。采用 DMPO 溶液在甲醇或 DMSO 溶液中捕获超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\bullet-}$ ，生成寿命较长且较稳定的自旋加合物 DMPO- $\text{O}_2^{\bullet-}$ ，也可能被质子化后生成 DMPO-OOH，或者两者共同存在于体系中。以光照 CdS-NP 反应体系为测试案例，其制备信息见 2.4.3.1。

（5）单线态氧 $^1\text{O}_2$ 的产生及制备

合成催化剂、新型材料的活化过硫酸盐的反应体系中，也会产生降解土壤有机污染物的主要活性氧物质为 $^1\text{O}_2$ 。光敏剂玫瑰红在波长 550 nm 光的激发下，电子转移至氧，是典型的产生单线态氧反应。常用捕获剂 TEMP/TPC 溶液捕获产生的单线态 $^1\text{O}_2$ ，生成寿命较长且较稳定的自旋加合物 TEMP/TPC- $^1\text{O}_2$ 。以光照过硫酸盐与孟加拉玫瑰红反应体系为测试案例，其制备信息见 2.4.3.2。

2.3.7 分析步骤

EPR 分析样品程序主要有以下几个步骤：

（1）装入样品

样品称样量由土壤中磁性物质的自旋浓度决定。通常，土壤样品置于内径为 3~4 mm 的石英样品管中，确保样品堆积紧实，使其高度约 1.5 cm 即可。溶液样品先吸入玻璃毛细管、硅油等封底，且高度应小于 4 cm，再放置于内径为 3 mm 石英样品管内。均需确保样品管外壁洁净，并且样品中心置于谐振腔的中心位置处。

注意：对于反应体系自由基变化较快的体系，制备操作与上机时间应该严格保持一致。

（2）设置仪器参数

○ 设置功率

在微波功率未饱和条件下,EPR 信号强度与微波功率的平方根成正比。但是,当功率饱和之后,EPR 信号强度与功率平方根的比例关系不再呈线性正比关系,而是会比线性关系预测的信号强度要小,信号峰也会出现一定程度的展宽。因此,在样品测试之初,应通过设置不同微波功率或磁场-功率二维实验,确立出合适的、未饱和的微波功率。

○ 设置频率

频率指示微波的振荡即与装入样品的谐振腔的频率保持一致,需确保其共振峰峰尖处于中心位置。

○ 调试相位

调试微波的相位,确保峰形尽量对称。

○ 调试耦合

耦合即调节 Iris,它是设置在波导和共振腔连接处的一个螺丝,调节螺丝的位置可控制谐振腔窗口的开口大小,使微波在谐振腔内达到最佳耦合。此调试对 EPR 谱图影响较大,在同一体系样品的测试过程中,可采用微调自动调试。

○ 磁场中心

测定土壤样品中 EPFRs 或污染土壤修复中反应产生的羟基自由基 $\text{HO}\cdot$ 、硫酸根自由基 $\text{SO}_4\cdot^-$,以及超氧阴离子 $\text{O}_2\cdot^-$ 、单线态氧 $^1\text{O}_2$ 等,若频率为 9.8 GHz,则其中心磁场中心约为 3500 G,也可通过粗略测试后根据图谱再修改为精确的数值,再进行第 2 次测试。在谐振腔中配备杜瓦进样附件时,相应的频率下降至约为 9.4 GHz,其磁场变为约 3350 G。

○ 扫描范围

自由基通常设置 100~200 G。

○ 扫描时间

扫描时间的设置与扫描点数的设置相关,可对应地适当作调整。扫描点数默认设置是 1024,则扫描时间可设 20~60 s。

○ 扫描次数

扫描次数默认设置为 1。若扫描次数为 n ,其信号增强 n 倍,其噪音增加 $\sqrt{n}$ 倍。因此,扫描次数的增加,有利于提升信噪比 (S/N)。扫描次数越多,得到结果的信噪比越好,随着一次次扫描,噪声会被平均掉,而信号则会逐渐叠加。根据具体样品的信号强度、噪音以及其受影响的因素等谨慎选择其合适的扫描次数。

○ 调制幅度

调制幅度的设置值应小于或等于峰-峰线宽。当出现平头峰时，应减小调制幅度的值，设置为小于 EPR 谱峰中最细的一条的峰峰值（Gauss）。调制幅度越小，信噪比越差，分辨率越高。若其值设置过大，还会导致 EPR 谱峰展宽严重，信号失真。

○ 放大倍数

信号接收端对信号的放大系数，单位 dB。实质为一放大倍数，对谱线的信噪比、分辨率等没有影响，越大谱线信号强度放大得越大，同时噪声也会被放大，过大会出现谱峰被切削的情况。

○ 测量

核查以上设置参数后，发送设置参数至仪器，运行扫描测试。

○ 核查信号

当初次扫描后，核查目标信号磁场中心、峰宽等信息，可根据实际情况对设置参数作微调与修正。

○ 数据保存

在以上优选条件下，完成样品测试后，应及时以唯一标识保存原始数据。

2.4 经典案例

2.4.1 稳定自由基

土壤中环境持久性自由基 EPFRs 是有代表性的稳定自由基，是土壤修复技术中定性定量研究的重要监测对象。方法验证实验中，以农业土壤成分分析标准物质 GBW (E) 070042 中持久性自由基为例，称取样品 0.1580 g 至内径为 4 mm 的石英管中，量取样品高度（1 cm），将石英管放入 EPR 谱仪的谐振腔中，并保持样品中间点处于居中位置。设置仪器参数：微波频率 9.822 GHz、中心磁场 3503 G、扫宽 100 G、微波功率 1.589 mW、调制幅度 1 G、扫描时间 40 s、扫描次数 1 次，获得 EPR 谱图见图 16，解析谱图可知 EPFRs 的 $g=2.0033$ 。

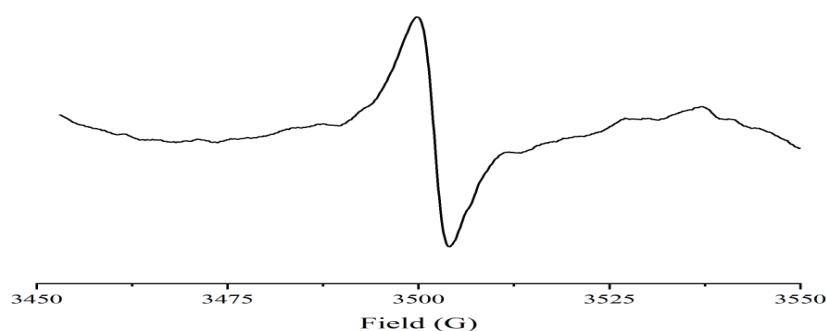


图 16 土壤 EPFRs 案例的 EPR 图谱

2.4.2 活泼自由基

2.4.2.1 羟基自由基 $\cdot\text{OH}$

土壤修复体系中,羟基自由基是最常见的活泼自由,以芬顿体系为经典案例。按照以下 4 个步骤操作流程开展该方法验证实验:(1)样品制备 移取 10 μL 1 M DMPO 溶液、70 μL 超纯水于 2 mL 棕色小瓶,再依次加入 10 μL 0.1 mM FeSO_4 溶液、10 μL 1 mM H_2O_2 溶液,迅速混合均匀,确保体系中 DMPO、 Fe^{2+} 、 H_2O_2 终浓度分别为 100 mM、0.01 mM、0.1 mM。(2)进样 使用直径为 1 mm 毛细管进样,进样高度为 2 cm,下端用硅脂封口。再将毛细管放入内径为 3 mm 的石英管后放入 EPR 谱仪的谐振腔中。(3)设置谱仪参数 微波频率为 9.838 GHz,设置中心磁场 3505 G、扫宽 150 G、微波功率 6.325 mW、调制幅度 1 G、扫描时间 40 s、扫描次数 1 次。(4)解析图谱 EPR 谱图见图 17,解析谱图可知 DMPO- $\cdot\text{OH}$, $g=2.0053$, $a_N=14.98$ G, $a_H=14.72$ G。

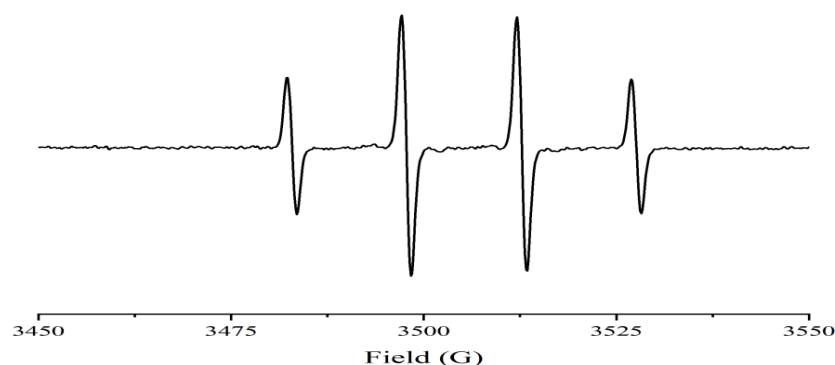


图 17 DMPO-OH 加合物的 EPR 案例图谱

2.4.2.2 硫酸根自由基 $\text{SO}_4^{\cdot-}$

催化或光照等是激发 PMS/PS 反应体系产生自由基的重要方式，是污染修复的重要研究内容，本团体标准方法验证以汞灯光照 PMS 并以 DMPO 捕获产生 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 自由基为案例。按照以下 4 个步骤操作流程开展该方法验证实验：（1）样品制备 移取 10 μL 2 M DMPO 溶液、20 μL 100 mM $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ 、170 μL 超纯水，混匀溶液数秒。（2）进样 使用内径为 1 mm 的毛细管吸取 50 μL ，下端硅脂封口，放入内径为 3 mm 的石英管，再放入 EPR 谱仪的谐振腔中心位置。（3）设置谱仪参数 微波频率为 9.837 GHz，Q 值为 3800，设置中心磁场 3505 G、扫宽 150 G、微波功率 6.325 mW、调制幅度 1 G、扫描时间 40 s、扫描次数 1 次，汞灯光照约 5 min 后扫描 EPR 谱图见图 18。（4）解析图谱 据图谱可知，DMPO-OH 与 DMPO- $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 均被捕获的混合图谱，通过模拟获得 DMPO- $\text{SO}_4^{\cdot-}$ （图 19），其图谱信息为： $g=2.0055$ ， $a_N=13.77$ G， $a_{H\beta}=10.12$ G， $a_{H\gamma 1}=1.41$ G， $a_{H\gamma 2}=0.75$ G。

2.4.3 活性氧物质

2.4.3.1 超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$

光照纳米颗粒反应体系产生活性氧是修复研究的重要方向，方法验证中以 CdS 纳米颗粒体系为案例。按照以下 4 个步骤操作流程开展该方法验证实验：

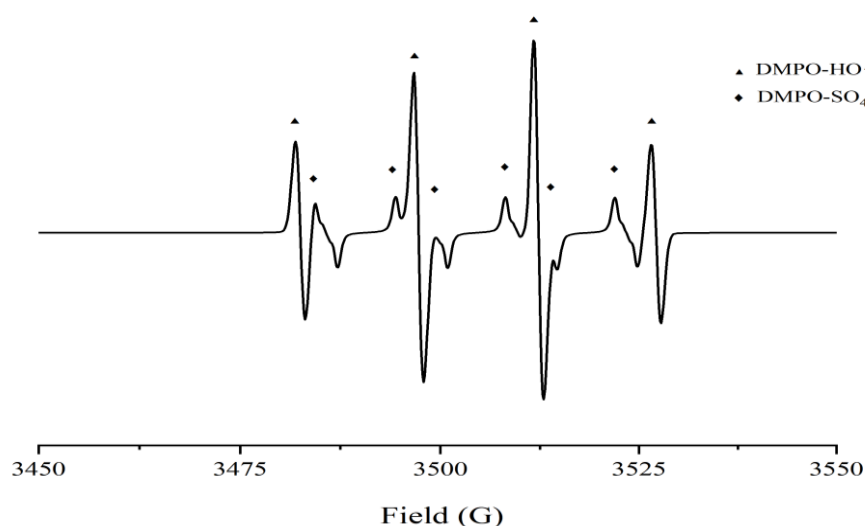


图 18 DMPO-OH+DMPO- $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 加合物的 EPR 案例混合图谱

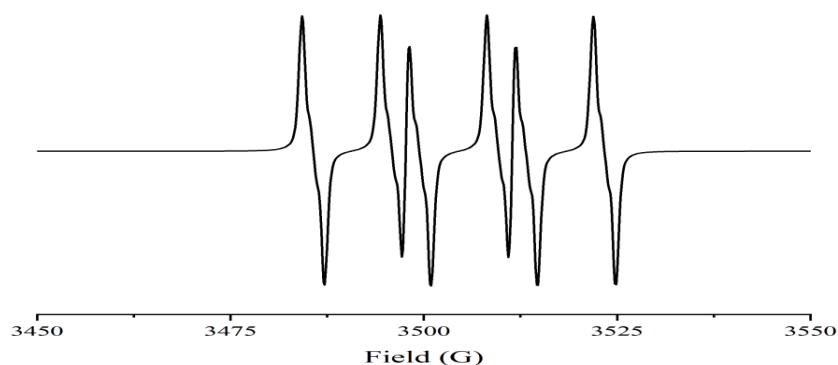


图 19 DMPO-SO₄^{•-}加合物的 EPR 案例模拟图谱

(1)样品制备 向分散在 90% DMSO 中的 CdS 纳米颗粒悬浮液中加入 DMPO, 确保体系中 DMPO、CdS-NP 浓度分别为 200 mM、1 g/L。(2)进样 使用直径为 1 mm 毛细管进样, 进样高度为 2 cm, 下端硅脂封口, 将毛细管放入内径为 3 mm 的石英管后置于 EPR 谱仪的谐振腔中心位置。(3)设置谱仪参数 设置微波频率 9.836 GHz, 中心磁场 3503 G、扫宽 200 G、微波功率 6.325 mW、调制幅度 1 G、扫描时间 40 s、扫描次数 1 次, 获得 DMPO-O₂^{•-}、DMPO-OOH、DMPO-R[•]、DMPO-RSO 均被捕获的混合图谱, 详见图 20。(4)解析图谱 解析模拟谱图获得 DMPO-O₂^{•-}、DMPO-OOH (图 21、22), 其中 DMPO-O₂^{•-}, $g=2.0066$, $a_N=12.81$ G, $a_{H\beta}=10.36$ G; DMPO-OOH, $g=2.0066$, $a_N=12.89$ G, $a_{H\beta}=10.24$ G, $a_{H\gamma 1}=1.53$ G。

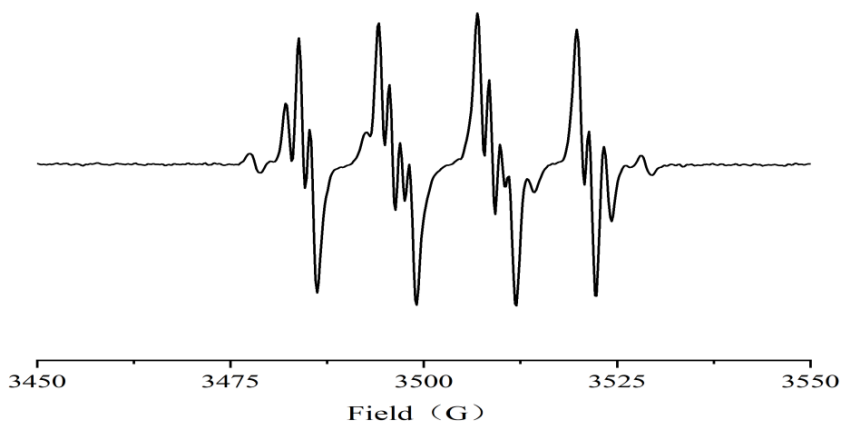


图 20 DMPO-O₂^{•-}、DMPO-OOH、DMPO-R[•]、DMPO-RSO 的 EPR 案例混合图谱

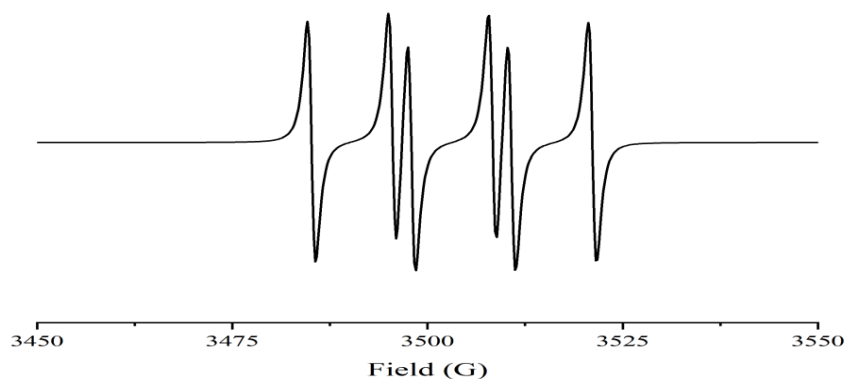


图 21 DMPO- $\text{O}_2^{\bullet}$ 加合物的 EPR 案例模拟图谱

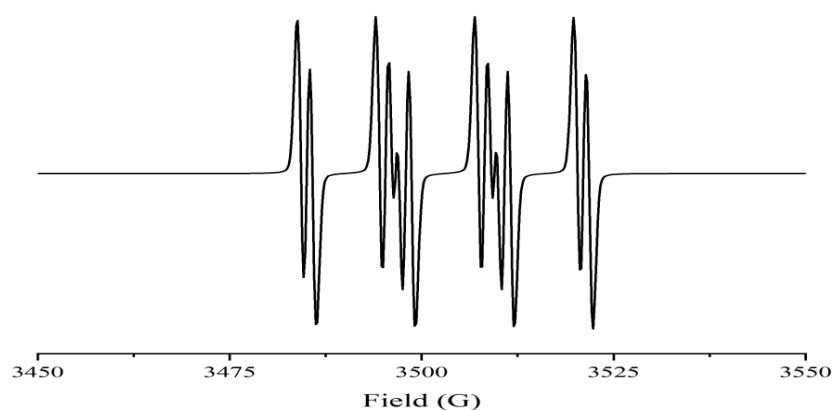


图 22 DMPO-OOH 加合物的 EPR 案例模拟图谱

2.4.3.2 单线态氧 $^1\text{O}_2$

纳米零价铁包覆碳复合材料体系产生活性氧是典型的污染修复案例。按照以下 4 个步骤操作流程开展该方法验证实验：（1）样品制备 向含有 0.2 g/L Fe@C800（纳米零价铁包覆碳复合材料，800 °C 水热碳化）、10 mM PMS 的体系中加入 TEMP，确保体系中 TEMP 浓度为 10 mM。（2）进样 使用直径为 1 mm 毛细管进样，进样高度为 2 cm，下端硅脂封口，将毛细管放入内径为 3mm 的石英管，并将其放入 EPR 谱仪的谐振腔中心位置。（3）设置谱仪参数 微波频率为 9.836 GHz，设置中心磁场 3503 G、扫宽 200 G、微波功率 6.325 mW、调制幅度 1 G、扫描时间 40 s、扫描次数 1 次，EPR 谱图见图 23。（4）解析图谱 解析谱图可知：TEMPO 的 $g=2.0063$ ， $a_N=17.23$ G。

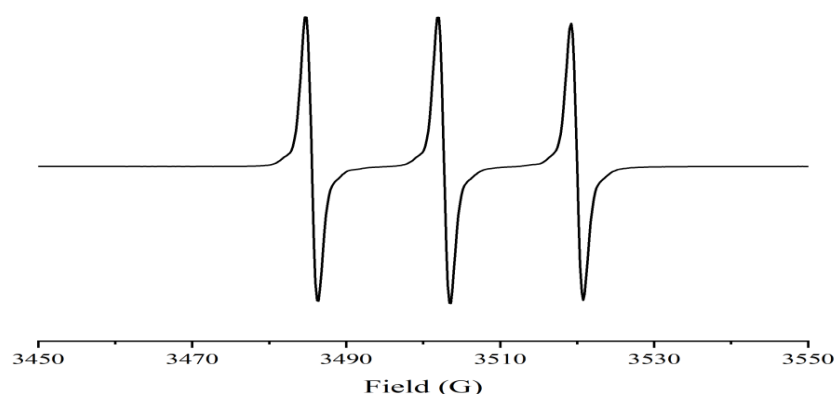


图 23 TEMPO 的 EPR 案例图谱

光敏剂孟加拉玫瑰红在波长 550 nm 光的激发下，电子转移至氧，是典型的产生单线态氧反应。按照以下 4 个步骤操作流程开展该方法验证实验：（1）样品制备 移取 100 μL 200 mM TPC 溶液、40 μL 5mM 孟加拉玫瑰红溶液、60 μL 50 mM PBS，混均溶液数秒。（2）进样 使用直径为 1 mm 毛细管进样，进样高度为 2cm，下端硅油封口，将毛细管放入内径为 3 mm 的石英管，并将其放入 EPR 谱仪的谐振腔中心位置。（3）设置谱仪参数 微波频率为 9.837 GHz，设置中心磁场 3504 G、扫宽 100 G、微波功率 20 mW、调制幅度 1 G、扫描时间 30 s、扫描次数 1 次，162 W 氙灯光照光照 30 min 后得 EPR 谱图，见图 24。（4）解析图谱 解析谱图可知：TPC- $^1\text{O}_2$ ， $g=2.0054$ ， $a_N=16.05$ G。

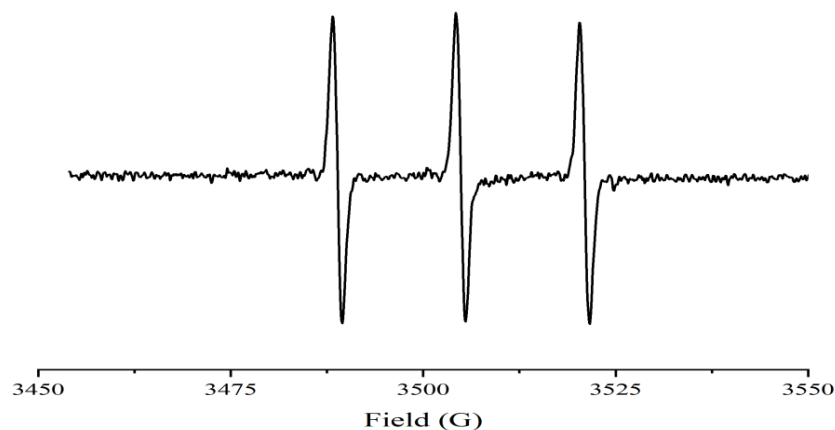


图 24 TPC- $^1\text{O}_2$ 的 EPR 案例图谱

三、方法学验证

3.1 方法检出限和定量限

为了确立标准方法的检出限及定量限，按照 GB/T 27417-2017 给出的方法，确定仪器最低响应值、方法检出限及定量限。首先，实验室已对配置一系列浓度 TEMPO 与 DPPH 进行测试，确定谱仪可靠地识别出分析物的最低浓度（300 nM TEMPO 与 10 μg/g DPPH），然后进行 11 次独立样品测试，以计算平行测定的标准偏差 s，方法检出限 MDL=最低可接受绝对量平均值+3s，方法定量限 MQL=最低可接受绝对量平均值+10s。当取样量为 50 μL，毛细管内径为 0.93 mm，石英管内径为 3 mm 时，以水为溶剂，TEMPO 检出限、定量限分别为 0.58 μM（ 3.49×10^{11} sp/μL）、1.13 μM（ 6.80×10^{11} sp/μL），以石蜡油为溶剂，TEMPO 检出限、定量限分别为 0.35 μM（ 2.11×10^{11} sp/μL）、0.60 μM（ 3.61×10^{11} sp/μL）。当称样量为 10mg，石英管内径为 4 mm 时，DPPH 检出限、定量限分别为 10.20 μg/g（ 1.56×10^{14} sp/mg）、11.40 μg/g（ 1.74×10^{14} sp/mg），详见表 3。

表 3 TEMPO、DPPH 检出限与定量限汇总表

物质名称		TEMPO				DPPH	
溶剂		水		石蜡油		KBr	
测定结果		浓度 μM	面积 Area	浓度 μM	面积 Area	浓度 μg/g	面积 Area
	1	0.39	0.33	0.25	0.92	9.92	4.48
	2	0.33	0.29	0.26	0.95	9.73	4.39
	3	0.38	0.32	0.21	0.84	9.87	4.46
	4	0.25	0.23	0.28	0.98	9.59	4.32
	5	0.27	0.24	0.24	0.89	9.46	4.26
	6	0.24	0.22	0.23	0.87	9.84	4.44
	7	0.28	0.25	0.18	0.78	9.44	4.25
	8	0.36	0.31	0.31	1.06	9.80	4.42
	9	0.51	0.41	0.25	0.92	9.66	4.36
	10	0.39	0.32	0.20	0.81	9.48	4.27
	11	0.36	0.30	0.23	0.88	9.76	4.41

平均值 x	0.34	0.29	0.24	0.90	9.69	4.37
标准偏差 s	0.079	0.057	0.036	0.077	0.17	0.08
检出限 MDL	0.58	0.46	0.35	1.13	10.20	4.62
定量限 MQL	1.13	0.86	0.60	1.67	11.40	5.20

3.2 正确度与精密度

3.2.1 g 因子

通过标准样品的 g 因子、分裂信息、线宽来实现质量的控制。

据参考资料，DPPH 固体（单晶）样品呈单峰， $g=2.0036\pm0.0003$ ，线宽为 0.1~0.4 mT。锰标 Mn^{2+} ，室温下，6 重峰，第三峰（ $g=2.0327\pm0.0002$ ）与第四峰（ $g=1.9803\pm0.02$ ）的间隔为 9.076 mT。6 重分裂的间隔从低场到高场稍有增加，线宽也如此。BDPA，单峰， $g=2.00254\pm0.00032$ 。

在水或者石蜡油中，TEMPO 呈 3 重分裂波谱图，其 $g=2.0045$ ， $a=1.54$ mT。

3.2.2 浓度

标准中，自旋浓度则参照 9.8.5 部分内容。若采用相对法，则需按照实验需求配置合理范围的标准曲线。验证实验中，考察 TEMPO 标准溶液范围 0~20 μM ，DPPH 标准范围 10~100 $\mu g/g$ ，且相关系数均 ≥ 0.999 ，能满足分析测试的要求。根据系列标准样品测试的面积与浓度的相关线性关系，来计算样品的体积或质量自旋浓度。若依据绝对法定量自由基与活性氧物质的自旋浓度，则不需要配置系列标准曲线，但需使用经过厂商定期校准与校验的设备进行检测。

3.2.3 重复性

为了验证本方法的重复性，依据 GB/T 27417-2017 给出的方法，选取了以水和石蜡油为溶剂的 TEMPO 和 DPPH 两种物质，并分别对低、中、高 3 个不同的浓度进行了 3 次平行测定，计算不同物质各浓度的相对标准偏差，具体结果见表 4。结果表明，整体上以水为溶剂的 TEMPO 的相对标准偏差有略高于以石蜡油为溶剂的 TEMPO 趋势。所有处理的中高浓度含 50 $\mu g/g$ 、150 $\mu g/g$ DPPH 和 8 μM 、15 μM TEMPO 的相对标准偏差均在 1.0% 以内，而低浓度 2 μM TEMPO 与 30 $\mu g/g$ DPPH 相对标准偏差较大，其相对标准偏差范围为 1.78~5.98%，仍然能够满足测

试精密度的要求。因此，EPR 谱仪测试结果具有良好的稳定性和精密度。

表 4 TEMPO 与 DPPH 精密度测定结果表

物质名称	TEMPO (μM)						DPPH (μg/g)		
溶剂	水			石蜡油			溴化钾		
浓度	2	8	15	2	8	15	30	50	150
峰面积 Area	1.36	5.63	10.54	4.76	17.03	32.97	14.48	23.97	74.92
	1.48	5.73	10.40	4.99	17.24	32.77	13.98	23.83	74.83
	1.32	5.72	10.49	4.77	17.15	32.83	14.28	23.63	74.62
平均值	1.39	5.70	10.48	4.84	17.14	32.86	14.13	23.81	74.79
标准偏差	0.08	0.05	0.07	0.13	0.11	0.10	0.25	0.17	0.15
相对标准 偏差 (%)	5.98	0.92	0.68	2.70	0.61	0.31	1.78	0.72	0.21

3.3 误差分析

误差来源主要有以下两个方面：一方面，来源于样品与标准制备的影响。如，捕获剂的变质导致产生错误的图谱信息；定量标准曲线的称量准确性；TEMPO 标准曲线在土壤中可能因吸附作用失准，需用土壤基质匹配标样；可使用 10 mM DTPA 抑制金属干扰。另一方面，来源于谱仪设置参数失准的影响。如，g 因子计算依赖精准磁场，仪器校准不足可导致±0.001 误差（相当于 10%浓度偏差）；功率过高使信号饱和失真（如·OH 在 20 mW 以上强度非线性；超过信号线宽的 1/3 会导致谱图展宽（如·OH 线宽 0.1 mT，调制幅度应≤0.03 mT）。在测试中，这些误差来源均应在测试过程中避免。

3.4 预期经济效益

制定具备先进性、科学性、适用性与合理性的《土壤修复中自由基与活性氧物质的测定 电子顺磁共振波谱法》团体标准可确保 EPR 数据的正确度与精密度，从而支撑土壤与环境领域污染修复研究的应用与发展。标准的建立也将避免数据

质量问题导致结论严重的偏离甚至错误的现象,进而推动电子顺磁共振波谱技术的应用与发展。在实际应用中,EPR 精准测定自由基浓度,可动态调整氧化剂(如过硫酸盐、 H_2O_2)的投加量,进而降低药剂使用成本。同时,电子顺磁共振波谱法与化学发光法、HPLC-MS 法等相比,具备图谱信息直观、检测时间短与成本低等优势,有助于缩短污染修复时间与节省资源。此外,本土壤修复团体标准将增强国产谱仪走向国际市场的技术能力。也将为《土壤污染防治法》等法规提供技术支撑,提升我国在全球土壤治理领域的话语权。

这一标准的制定不仅是土壤修复分析的技术规范,也将会被科研院所、大专院校、环保部门和第三方检测实验室采用,更是连接农业生产、生态安全与社会发展的重要纽带,其效益将随标准发布实施而逐步显现,并对将来土地资源可持续利用产生深远影响。

四、标准涉及的相关知识产权说明

目前国际标准尚未土壤与环境领域相关方法。

五、采用国际标准的程度与水平的简要说明,与现行有关法律法规和强制性标准的关系

本标准未涉及国际标准的采用。

1、制标过程遵循《中华人民共和国标准化法》《中华人民共和国农业法》《中华人民共和国农产品质量安全法》《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国土壤污染防治法》《农产品产地安全管理办法》等法律法规。

2、标准中计量单位采用法定计量单位。

3、标准的格式,编制和表达方法,按国家标准的要求制订。

4、标准与现行法律、法规和强制性标准无冲突。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编写过程中无意见分歧情况。

七、其他应予说明的事项

无。