

T/SSSC

中 国 土 壤 学 会 团 体 标 准

T/SSSC 021—2025

**土壤中自由基与活性氧的检测
电子顺磁共振波谱法**

Measuring for free radicals and reactive oxygen species generated by soil system
—Electron paramagnetic resonance spectroscopy

2025 – 11 – 27 发布

2025 – 12 – 01 实施

中国土壤学会 发 布

目 次

前 言 II

1 范围.....3

2 规范性引用文件.....3

3 术语和定义3

4 方法原理.....4

5 试剂和材料5

6 仪器设备6

7 样品采集和预处理.....6

8 样品的制备6

9 分析测试7

10 检出限与定量限.....10

11 质量控制10

12 试验报告11

附 录 A （资料性） EPFRs 的 EPR 图谱.....12

附 录 B （资料性） DMPO-•OH 的 EPR 图谱.....13

附 录 C （资料性） DMPO-SO₄⁻•的 EPR 图谱14

附 录 D （资料性） DMPO-O₂⁻•的 EPR 图谱.....15

附 录 E （资料性） TEMPO 的 EPR 图谱.....16

附 录 F （资料性） 谱仪设置参数.....17

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国土壤学会提出并归口。

本文件起草单位：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

本文件主要起草人：蒋倩、苏吉虎、唐金晶、唐昊冶、王玉军、方国东、韩超、宋静、刘云、曹蓉、王彦、仰贤莉、范巧君、杨磊、王肖磊

土壤中自由基与活性氧的检测 电子顺磁共振波谱法

1 范围

本文件描述了一种用电子顺磁共振波谱（X-波段）检测土壤中稳定自由基、土壤修复中常见的活泼自由基和活性氧的方法。

本文件适用于土壤环境持久性自由基和土壤修复中羟基自由基、硫酸根自由基、超氧阴离子、单线态氧的检测。

土壤反应体系中其他自由基的检测也可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

ISO/TS 18827 Nanotechnologies-Electron spin resonance (ESR) as a method for measuring reactive oxygen species (ROS) generated by metal oxide nanomaterials

ISO 16720 Soil quality - Pretreatment of samples by freeze-drying for subsequent analysis

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 32722 土壤质量 土壤样品长期和短期保存指南

GB/T 41917 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 42363 土壤质量 土壤理化分析样品的预处理

JY/T 0579 电子顺磁共振波谱分析方法通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 电子顺磁共振波谱法 electron paramagnetic resonance spectroscopy

简称EPR，亦称电子自旋共振波谱（electron spin resonance spectroscopy, ESR），是研究含有未配对电子的磁性物质的电磁波谱法。

3.2 自由基 free radicals

具有未成对电子的原子或基团。根据其相对稳定性划分为稳定自由基和活泼自由基。稳定自由基具备稳定的分子结构，半衰期较长，可以稳定数分钟到几十天。例如，土壤中环境持久性自由基（environment persistent free radicals, EPFRs）。活泼自由基通常表现很活泼，在反应过程中仅能瞬时存在，半衰期非常短。例如，羟基自由基（ $\bullet\text{OH}$ ）、硫酸根自由基（ $\text{SO}_4^-\bullet$ ）。

3.3 活性氧 reactive oxygen species

从生物学的角度看，被广泛研究的活性氧主要包括羟基自由基（ $\bullet\text{OH}$ ）、超氧阴离子（ $\text{O}_2^{\bullet-}$ ）和单线态氧（ $^1\text{O}_2$ ）。

3.4 自旋捕获 spin trapping

用于短寿命自由基的检测，自旋捕获剂与短寿命自由基生成相对稳定的长寿命自由基（自旋加合物）。常用的捕获剂有DMPO（5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物）、TEMP（2,2,6,6-四甲基哌啶）等。

3.5 g 因子 g factor

反映分子内局部磁场的特征，是物质结构信息的重要参数。其数值大小可指示未成对电子的基本信息，包括类型与种类，自由基或过渡金属离子，所在的轨道信息及配位情况。

3.6 超精细相互作用 hyperfine interaction

未成对电子与磁性核间的磁相互作用。

3.7 超精细结构 hyperfine structure

由超精细相互作用产生的谱线。各向同性中超精细分裂耦合常数表示符号 a ，而各向异性中超精细张量用 A 表示，单位均为G或者mT。比如，氮氧自由基，EPR谱图为3条等间距的峰，超精细耦合常数即为此3条峰中相邻两条峰的距离。

注：1 mT=10 G。

3.8 自旋浓度 spin concentration

单位质量或体积中所含未成对电子的数目（自旋数）。

3.9 Q 因子 quality factor

表征谐振腔内微波能量的存储和损耗，决定着谐振腔的品质，其值受到腔内空间、样品管直径、样品形态、质量、水分含量等因素的影响。Q值越大，品质越好，谱仪灵敏度越高。

3.10 线宽 line width

用吸收曲线的半峰高处的半宽度或者一次微分线的峰-峰之间的宽度来描述。符号 ΔH_{pp} 表示，单位为G或mT。

4 方法原理

含未配对电子（如，环境持久性自由基、羟基自由基的捕获加合物等）的样品放置于电子顺磁共振波谱仪的谐振腔中，当吸收电磁辐射且能量 $h\nu$ 与未成对电子的能级之间间距 ΔE 相匹配时（公式1），可激发两个塞曼能级之间的跃迁，即发生电子顺磁共振现象。信号经采集处理可得到共振一次微分谱线。同时，电子自旋磁矩与磁性核（如，DMPO中的N与 H_β ）会产生相互作用，光谱进一步分裂成更多的谱线（超精细分裂）。

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \dots\dots\dots (1)$$

式中：

h — 普朗克常数， $6.62607015 \times 10^{-34}$ ，单位为焦耳秒（J·S）；

ν — 微波频率，单位为赫兹（Hz）；

g — g 因子；

β — 玻尔磁子, $9.2740100783 \times 10^{-24}$, 单位为焦耳每特斯拉 (J/T);
 H — 共振磁场强度, 单位为高斯 (G) 或者毫特 (mT)。

5 试剂和材料

5.1 标准样品

5.1.1 1,1-二苯基-2-苦基肼基 (DPPH): 纯度 $\geq 99\%$ 。以 KBr 固体粉末为溶剂, 配制 0、10、30、50、75、100 $\mu\text{g/g}$ 系列浓度。可从市售购买。

5.1.2 锰标 (Mn^{2+}): 可从市售购买。

5.1.3 双二苯四烯基-苯络合物 (BDPA): 可从市售购买。

5.1.4 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基自由基 (TEMPO): 纯度 $\geq 99\%$ 。在石蜡油或水中, 配制 0、1、2、5、10、20 μM 系列浓度。

注1: 分散于KBr中10~100 $\mu\text{g/g}$ DPPH建议当日配制并使用。避光、4℃条件下, 1~20 μM TEMPO溶液可保存4周。

注2: 溶剂石蜡油较水的稳定性与信号强度更强, 应根据捕获体系的溶剂选用石蜡油或水配制标准曲线。

注3: 配制标准曲线浓度范围可根据需求增减。

注4: 可购买市售的其他标准样品。

注5: 已制备的标准溶液, 用氩气或者氮气除去氧, 可有效防止氧气反应导致的图谱增宽。

5.2 试剂

水为GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.1 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO): 纯度 $\geq 99\%$ 。用超纯水溶解至 1 M 或 2 M。

5.2.2 2,2,6,6-四甲基哌啶酮 盐酸盐 (TEMP): 纯度 $\geq 99\%$ 。用超纯水溶解至 1 M。

5.2.3 硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 纯度 $\geq 99.95\%$ 。以超纯水溶解, 配制成 1 mM, 稀释至 0.1 mM, 现配现用。

5.2.4 双氧水 (H_2O_2 , 30%): 优级纯。以超纯水稀释, 配制成 100 mM, 稀释至 1 mM, 现配现用。

5.2.5 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH=7.4): 优级纯。取磷酸二氢钾 1.36 g, 加 0.1 M 氢氧化钠溶液 79 mL, 用水稀释至 200 mL 即可得 50 mM 缓冲溶液。亦可从市售购买。

5.2.6 过硫酸钾 ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$): 纯度 $\geq 99\%$ 。以超纯水稀释, 配制成 1 M, 稀释至 100 mM。

5.2.7 过一硫酸氢钾 (KHSO_5): 纯度 $\geq 99\%$ 。以超纯水稀释, 配制成 1 M, 稀释至 100 mM。

5.2.8 甲醇 (CH_3OH): 色谱纯。

5.2.9 二甲基亚砜 (DMSO): 色谱纯。

注1: DMPO、TEMP等捕获试剂浓度可根据需求增减。

注2: 注意TEMP的同系物(如, 醇、酮)的溶解性及使用的pH范围。

注3: 据实验pH的需求, 捕获反应体系也可用PBS为溶剂。

注4: DMPO、TEMP应避光存于-20℃冰箱。

注5: 其他溶液试剂避光、4℃保存。

5.3 材料

5.3.1 石英管: $\phi 3 \sim 4$ mm, 管长 12 cm。

5.3.2 离心管: 1.5 mL。

5.3.3 移液器枪头: 10 μL ~1 000 μL 。

5.3.4 玻璃毛细管: $\phi 1$ mm, 管长 10 cm。

注1: 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。

注2：对于微波损耗较大的液体样品可选用适合的扁平池或其他与谐振腔适配的进样器皿。

6 仪器设备

6.1 尼龙筛：0.149 mm 孔径（100 目）。

6.2 分析天平：感量为 0.0001 g。

6.3 移液器：10 μL ~1 000 μL 。

6.4 涡旋仪：800~2000 r/min, 1 s~120 s。

6.5 电子顺磁共振波谱仪：亦叫电子自旋共振波谱仪，具备 X-波段连续波扫描功能。

6.6 光源：汞灯或氙灯，功率 10~150 W。

7 样品采集和预处理

土壤样品的采集和保存依据 GB/T 32722，其预处理参照 ISO 16720 或 GB/T 42363，应避免对于待测自由基的影响。

8 样品的制备

8.1 环境持久性自由基 EPFRs

土壤样品经预处理（7），过筛（6.1）。称取约 5~500 mg（精确至 0.0001 g）于直径 3~4 mm 石英管中，待测。以土壤样品为测试案例，其制备信息见附录 A。

注：样品高度受限于谐振腔最灵敏状态的上限值。

8.2 土壤悬浊液

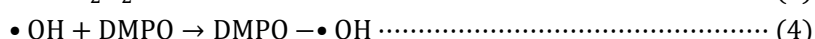
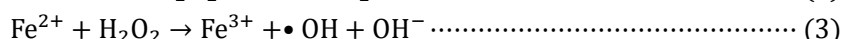
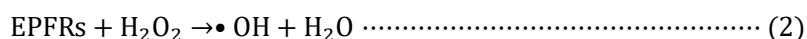
用去离子水现配制（污染）土壤分散溶液，并用涡旋仪（6.4）混匀。配制 500 μL 溶液备用，土壤反应体系中大约需 50~200 μL 。不同类型的土壤反应体系中产生的自由基与活性氧水平不同，可通过实验确认浓度。

注1：超声会产生自由基，混合时应避免使用。

注2：土壤质量与纯水的比例可根据需求增减，案例附录 B、C、F 中采用 0.25 g 土壤与 0.625 mL 纯水混匀，即 1:2.5。

8.3 羟基自由基 $\bullet\text{OH}$

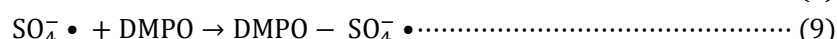
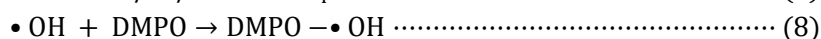
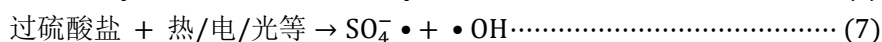
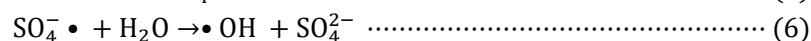
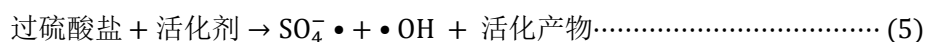
土壤中环境持久性自由基、有机质醌自由基、矿物中金属离子等均可介导芬顿（Fenton）反应产生羟基自由基 $\bullet\text{OH}$ ，其主要反应式为：



常用捕获剂 DMPO 溶液捕获产生的羟基自由基 $\bullet\text{OH}$ ，生成寿命较长并且比较稳定的自旋加合物 DMPO- $\bullet\text{OH}$ 。在土壤悬浊液（8.2）中，以芬顿反应体系为测试案例，其制备信息见附录 B。

8.4 硫酸根自由基 $\text{SO}_4^{\bullet-}$

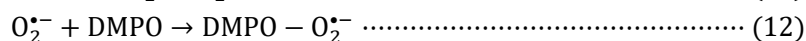
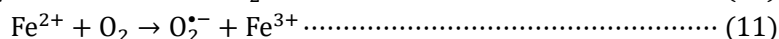
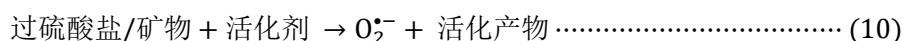
活化过硫酸盐体系可产生 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 与 $\cdot\text{OH}$ ，并被广泛应用在有机污染土壤的修复研究中。活化方法可归为两类：化学法，加入过渡金属离子、氧化剂、强碱等试剂后体系发生反应；物理法，采用紫外光照、热、电解、超声波等物理的技术方式来活化过硫酸盐。两种方法均可促使其过氧键断裂，产生氧化性自由基 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 。通用反应式可表示为：



在水体系中，捕获剂DMPO溶液可同时捕获 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ，生成寿命较长且较稳定的自旋加合物 $\text{DMPO} - \cdot\text{OH}$ 与 $\text{DMPO} - \text{SO}_4^{\cdot-}$ ；若在DMSO等试剂中，由于 $\cdot\text{OH}$ 被淬灭，可获得 $\text{DMPO} - \text{SO}_4^{\cdot-}$ 图谱。在土壤悬浊液（8.2）中，以光照过硫酸盐反应体系为测试案例，其制备信息见附录C。

8.5 超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$

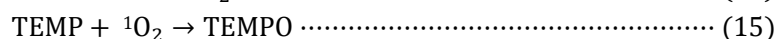
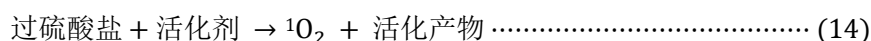
在新型材料、合成催化剂活化矿物、过硫酸盐反应体系中，也可产生活性物质 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，进而实现对土壤有机污染物的降解。



捕获剂DMPO溶液在DMSO或者甲醇体系中捕获产生的超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，生成寿命较长并且比较稳定的自旋加合物 $\text{DMPO} - \text{O}_2^{\cdot-}$ ，也可能被质子化后生成 $\text{DMPO} - \text{OOH}$ 。以光照CdS-NP反应体系为测试案例，其制备信息见附录D。

8.6 单线态氧 $^1\text{O}_2$

合成催化剂、新型材料的活化过硫酸盐的反应体系中主要活性物质 $^1\text{O}_2$ 可实现对污染土壤的修复。其反应机理主要为：



捕获剂TEMP溶液捕获单线态氧 $^1\text{O}_2$ ，生成寿命较长且较稳定的自旋加合物TEMPO。在土壤悬浊液（8.2）中，以光照过硫酸盐反应体系为测试案例，其制备信息见附录E。

注1：8.3~8.6中，现场开展捕获，测试时间据实验而定，土壤悬浊液较纯化学反应体系复杂。

注2：反应体系各物质终浓度亦可根据实际需求自行进行增减。

注3：8.3~8.6中，案例仪器设置参数，详见附录G。

9 分析测试

EPR分析样品程序主要有以下几个步骤（图 1）。

9.1 开机

按照仪器操作规程，依次打开电脑电源、空气开关、冷却水循环系统、电源控制器及控制柜。连接仪器控制软件，1小时后仪器可达最佳状态。

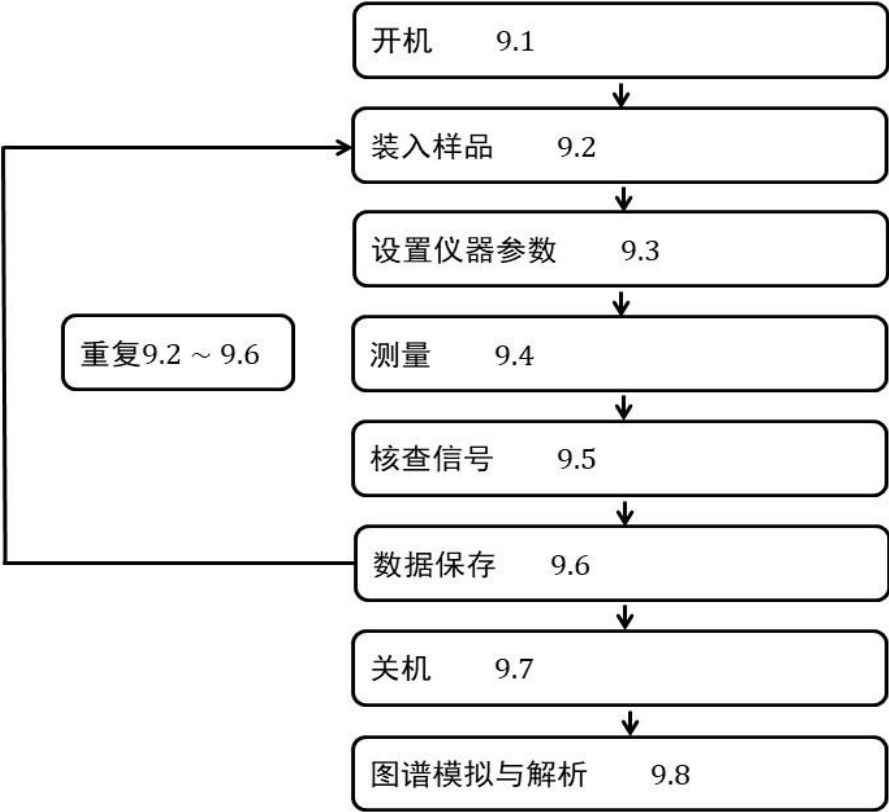


图1 EPR 分析测试主要步骤

9.2 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，土壤样品置于样品管（5.3.1）中，需确保样品堆积紧实，使其高度约1.5 cm即可。

毛细管（5.3.4）吸入溶液样品、硅脂封下端口，且高度应小于4 cm，再放置于样品管（ $\phi 3\text{ mm}$ ）（5.3.1）内。并放置于样品中心与谐振腔中心位置重合处。

9.3 设置仪器参数

参照资料性附录G进行设置。

9.4 测量

发送设置参数至仪器，运行扫描测试。

9.5 核查信号

当初次扫描后，核查目标信号信号强度、磁场中心、峰宽等信息，可根据实际需求与主要参数的意义进行优化与增减，参照资料性附录G。

9.6 数据保存

完成样品测试后，应及时以唯一标识保存原始数据。

9.7 关机

遵照仪器操作规程关闭仪器。微波衰减功率调至大于30 dB，谱仪由运行切换至调谐状态，取出样品并妥善处理回收。然后，仪器调至待机状态，窗口磁场调至0 G。断开仪器与软件的连接后，再依次关掉软件、电脑、控制台、电源控制器、水循环、空气开关。

9.8 图谱模拟与解析

9.8.1 图谱模拟

可在仪器配置软件或行业内常用的软件上进行数据解析。图谱经模拟可导出单个自由基的EPR信息。也可对多个自由基混合图谱进行模拟及分离，并分别获得相关信息。

9.8.2 图谱解析

对EPR数据进行解谱分析，从而获得土壤样品中EPFRs、有机污染土壤修复体系中相关自由基与活性氧物质的g因子、超精细结构和自旋浓度。

9.8.3 g因子

可由比较法和绝对法获取，参照JY/T 0579。

a) 比较法

采用标准样品DPPH（单峰）或锰标（六峰）与待测样品同时测量EPR谱图并记录于谱图上，再计算。用单峰标准样品与多峰标准样品分别对应单标法与多标法，公示（1）可转化为计算公式：

$$\nu = \frac{g_S \beta B_S}{h} = \frac{g_X \beta B_X}{h} \dots\dots\dots (16)$$

$$g_X = \frac{g_S B_S}{B_X} \dots\dots\dots (17)$$

式中：下标 s、x 分别表示标准样品、待测样品。

注1：据参考资料，对于EPFRs 的g因子解谱分析：若 $g < 2.0030$ ，则表明以碳为中心，例如，芳烃类自由基。若 $2.0030 < g < 2.0040$ ，则表明以碳氧为中心或碳中心与氧中心混合物。若 $g > 2.0040$ ，则是以氧原子为中心，例如，半醌自由基。

注2：据参考资料，活泼自由基可被捕获后生成更加稳定的氮氧自由基加合物。如，DMPO-•OH、DMPO-SO₄⁻•、DMPO-O₂⁻•、DMPO-OOH、TEMPO，其g因子通常约为2.0050~2.0060。

b) 绝对法

把普朗克常数与玻尔磁子代入式（1）中后，得出计算g值的公式。

$$g = 714.47735 \times \frac{\nu}{B_0} \dots\dots\dots (18)$$

式中：

ν —— 测试时实际频率，单位为吉赫兹（GHz）；

B_0 —— 磁场强度，单位为高斯（G）。

计算结果保留至小数点后四位。商品谱仪可由软件直接记录频率与中心磁场并自动完成g值的计算。

9.8.4 超精细结构

稳定自由基，如EPFRs案例超精细分裂，参见附录A。

对于溶液样品中的自由基，一个未成对电子与一个磁性核的相互作用遵循“二项式系数表示法”。按照 $\Delta m_s = \pm 1$ 与 $\Delta m_l = 0$ 的选律，决定着发生跃迁的能级和谱线数目。可得到 $2I+1$ 条等强度的谱线，且相邻两条线的距离为a或者A常数。此外，一个未成对电子与多个磁性核的相互作用，在《电子顺磁共振波谱》

一书中从 $I=1/2$ 的不同个数及大于 $1/2$ 等5类情况进行了详细的推导,可结合研究体系进行对照并解析图谱。

活泼自由基与活性氧物质,如DMPO- $\bullet$ OH、DMPO- $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 、DMPO- $\text{O}_2^{\bullet-}$ 、TEMPO案例的超精细分裂历程,详见附录B~E。

超精细分裂中谱线的数目、间隔与相对强度,可以判断与电子相互作用的核自旋的类型、数量及相互作用强弱,有助于确定自由基等顺磁性物质的分子结构。

9.8.5 自旋浓度

A) 相对法

准确称量DPPH或TEMPO并配制已知浓度的标准曲线,浓度范围可参照(5.1.1~5.1.4),且不少于5个点,根据标准溶液EPR谱线面积与已知摩尔浓度的线性关系,可计算出样品的摩尔浓度。标准曲线的线性相关系数应 ≥ 0.999 。

注1: TEMPO 分子含一个稳定的氮氧自由基。

注2: 摩尔浓度与自旋数的计算参照ISO/TS 18827(同GB/T 41917)。1 μM TEMPO自由基数目是 3.0×10^{14} sp。

B) 绝对法

EPR积分信号涉及微波功率、微波磁场、调制幅度、接收增益等10余个参数。部分谱仪采用成像技术,测量确定自旋数定量计算公式中的两个物理量(c, f),并存储到谱仪的硬件中,再结合测量实际样品的Q值,从而获得公式中所有参量值,实现绝对定量计算。在EPR软件定量窗口中,输入样品管内径、样品高度、谐振腔中心距离和电子自旋数,可自动计算获取自旋数。以电子自旋数除以样品质量或体积,即获得自旋浓度。

10 检出限与定量限

以10 mg 10 $\mu\text{g/g}$ DPPH固体样品(分散于KBr粉末中)与50 μL 300 nM TEMPO溶液(溶于石蜡油中)为检测案例,采用绝对法(9.8.5)的检出限分别为: 3.88×10^{12} sp/mg、 4.89×10^{10} sp/ μL , 定量限分别为 4.29×10^{12} sp/mg、 6.88×10^{10} sp/ μL 。

11 质量控制

11.1 设备检定或校准

在检测样品之前,应按照仪器检定规程对谱仪进行检定或校准,并符合相应要求。

11.2 空白试验

按照相同实验步骤(9.1~9.7),对每个反应体系的捕获试剂空白及对照空白进行检测。

11.3 正确度

通过标准样品的g因子、分裂信息、线宽来实现质量的控制,参照(9.8.3)。自旋浓度参照(9.8.5)。

注1: DPPH固体(单晶)样品呈单峰, $g=2.0036 \pm 0.0003$, 线宽为0.1~0.4 mT。

注2: 室温下, 锰标 Mn^{2+} 为6重峰, 第3峰($g=2.0327 \pm 0.0002$)与第4峰($g=1.9803 \pm 0.02$)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。

注3: BDPA(双二苯四烯基)-苯络合物, 单峰, $g=2.00254 \pm 0.00032$ 。

11.4 精密度

必要时，设置平行性实验。相对标准偏差应 $\leq 10\%$ 。

12 试验报告

至少包含以下内容：

- a) 文件编号；
- b) 样品制备信息：环境温度、湿度、反应浓度、反应条件；
- c) 仪器检测参数信息：微波功率、微波频率、中心磁场及范围、调制幅度、扫描时间等信息；
- d) 原始数据文件；
- e) 试验日期。

附录 A
(资料性)
EPFRs 的 EPR 图谱

EPFRs测试案例样品制备：称取土壤样品质量0.1580 g，置于内径4 mm石英样品管中，样品高度为1 cm。土壤中EPFRs的EPR图谱见图A.1。

EPFRs超精细分裂，由于电子周围无磁性核或超精细耦合太弱，电子自旋共振仅出现一个和 $m_s = +1/2$ ， $-1/2$ 两个态之间跃迁相对应的共振峰。

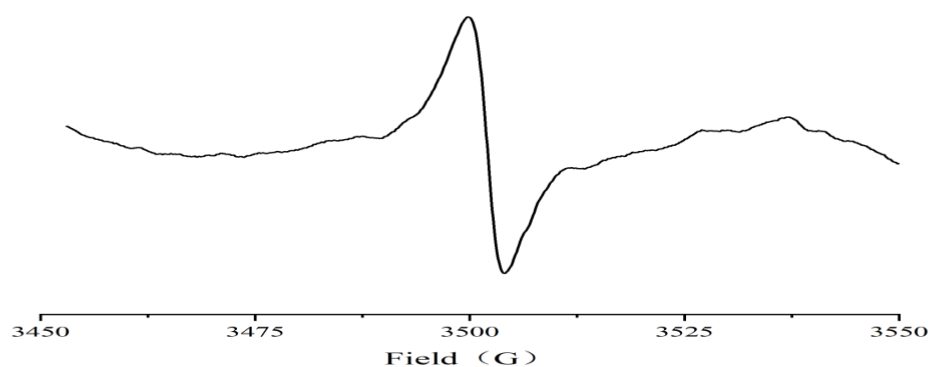


图 A.1 案例土壤 EPFRs 图谱

注：图谱解析信息，单峰， $g=2.0033$ 。

附录 B

(资料性)

DMPO-•OH 的 EPR 图谱

芬顿反应体系测试案例中,土壤悬浊液、DMPO、 Fe^{2+} 、 H_2O_2 的终浓度分别为0.28 g/mL、100 mM、0.01 mM、0.1 mM,捕获10分钟后测试,其EPR混合图谱与DMPO-•OH模拟图谱见图B.1与B.2。

DMPO是一个环状吡咯酮衍生物,在捕获自由基反应中,•OH进攻 $\text{C}_\alpha=\text{N}$ 双键上的 C_α 原子,形成稳定加合物DMPO-•OH。EPR图谱,即为未成对电子与1个N核、1个H核的相互作用而产生的超精细线。据二项式规则(9.8.4),N核将谱线分为3个($I=1, 2\times 1+1=3$), H_β 将进一步分裂为2个($I=1/2, 2\times 1/2+1=2$),由于 $a_N\approx a_H$, EPR图谱峰原本6个峰中间两两发生了重叠,最终形成4重峰,其强度比例为1: 2: 2: 1, 如下图:

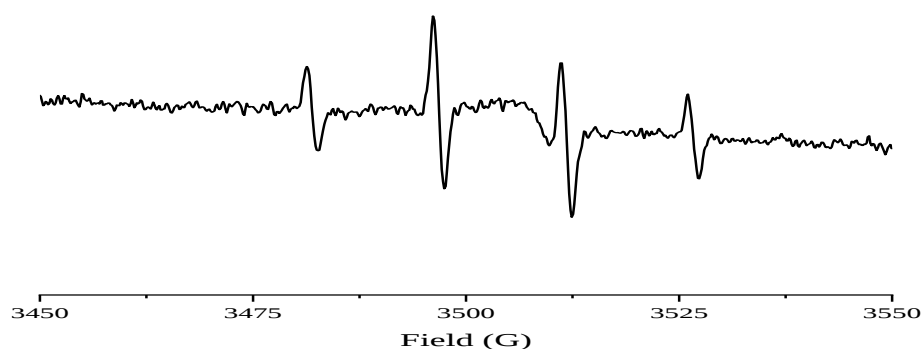


图 B.1 案例混合谱图

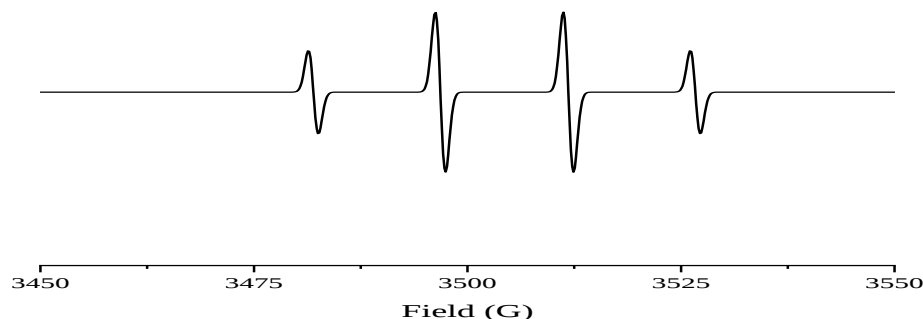


图 B.2 案例 DMPO-•OH 的模拟谱图

注: 图谱解析信息, 4重峰, $g=2.0055$, $a_N=14.99\text{ G}$, $a_H=14.75\text{ G}$ 。

附录 C

(资料性)

DMPO-SO₄⁻•的 EPR 图谱

汞灯光照过硫酸钾反应测试案例中,土壤悬浊液、DMPO、PDS的终浓度分别为0.28 g/mL、100 mM、10 mM,捕获12分钟后测试,其EPR混合图谱和DMPO-SO₄⁻•加合物模拟图谱见图C.1与C.2。

DMPO是一个环状吡咯酮衍生物,在捕获自由基反应中,SO₄⁻•自由基进攻C_α=N双键上的C_α原子,形成稳定加合物DMPO-SO₄⁻•。EPR图谱,即为未成对电子与1个N核、1个H_β核,弱耦合的H_γ的相互作用而产生的超精细线。据二项式规则(9.8.4),N核将谱线分为3个(I=1, 2×1+1=3),H_β将进一步分裂为2个(I=1/2, 2×1/2+1=2),由于a_N>a_H,DMPO-SO₄⁻•的图谱峰经H_{γ1}裂为6×2=12峰,再经H_{γ2}分裂12×2=24且中间两两重叠,最后呈现18重峰。图谱如下:

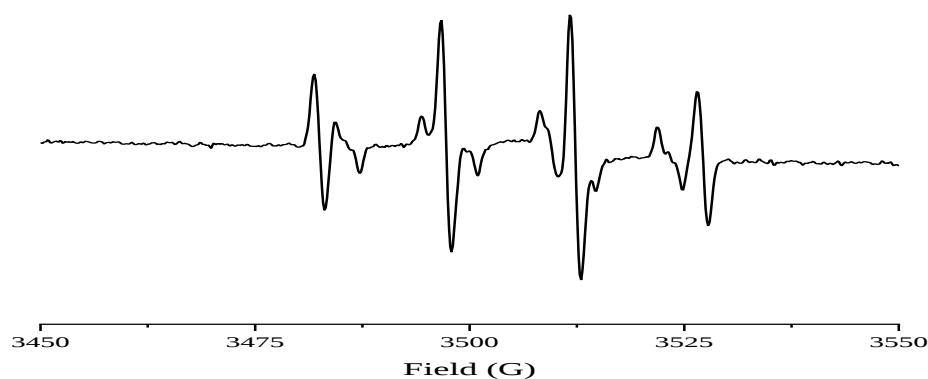
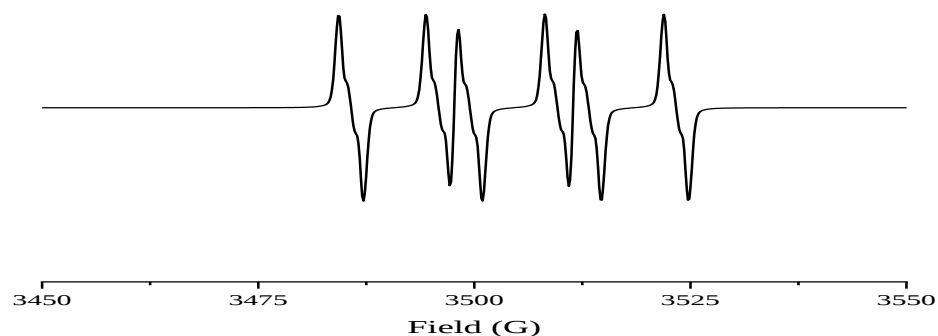


图 C.1 案例 EPR 混合谱图

图 C.2 案例 DMPO-SO₄⁻• 的模拟谱图

注: 图谱解析信息, 18重峰, $g=2.0056$, $a_N=13.76$ G, $a_{H\beta}=10.10$ G, $a_{H\gamma1}=1.38$ G, $a_{H\gamma2}=0.75$ G。

附录 D
(资料性)
DMPO-O₂^{•-}的 EPR 图谱

光照活化纳米颗粒CdS-NP反应体系测试案例中,在90% (v/v) DMSO中,DMPO、CdS-NP的终浓度分别为200 mM、1 g/L,其EPR混合图谱及DMPO-O₂^{•-}、DMPO-OOH加合物的模拟图谱见图D.1~D.3。

DMPO是一个环状吡咯酮衍生物,捕获O₂^{•-}后,生成加合物DMPO-O₂^{•-}。在捕获自由基反应中,O₂^{•-}自由基进攻C_α=N双键上的C_α原子,形成稳定加合物DMPO-O₂^{•-}。其EPR图谱,即为未成对电子与1个N核、1个H核的相互作用而产生的超精细线。据二项式规则(9.8.4),N核将谱线分为3个(I=1, 2×1+1=3),H_β将进一步分裂为2个(I=1/2, 2×1/2+1=2),由于a_N>a_H,EPR图谱峰为6重峰。实验中,DMPO-O₂^{•-}可能被H_γ质子化,每个峰再次被分裂为2个,转化为DMPO-OOH,EPR图谱峰为12重峰。分别见下图:

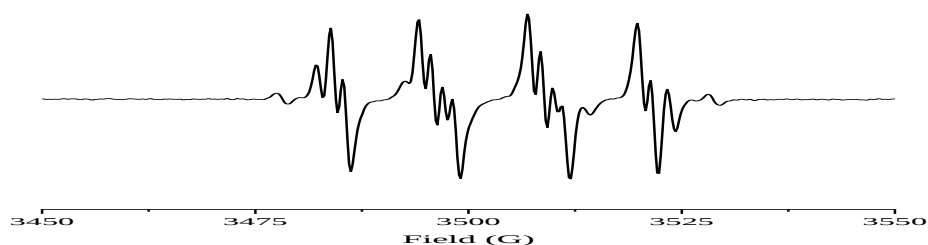


图 D.1 案例 EPR 混合谱图

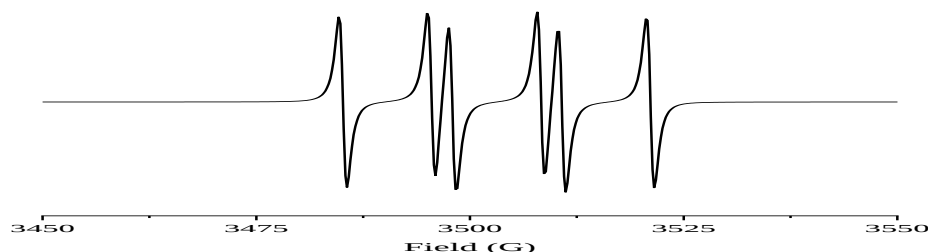


图 D.2 案例 DMPO-O₂^{•-}的模拟谱图

注: 图谱解析信息, 6重峰, $g=2.0066$, $a_N=12.99$ G, $a_{H\beta}=10.21$ G。

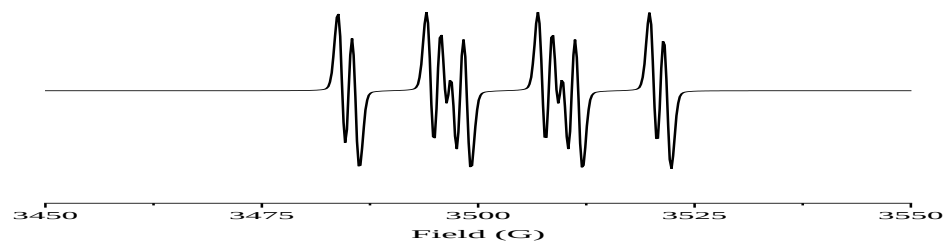


图 D.3 案例 DMPO-OOH 的模拟谱图

注: 图谱解析信息, 12重峰, $g=2.0066$, $a_N=12.89$ G, $a_{H\beta}=10.24$ G, $a_{H\gamma}=1.53$ G。

附录 E (资料性) TEMPO 的 EPR 图谱

碳包覆纳米零价铁复合材料反应体系测试案例中，土壤悬浊液、TEMP、碳包覆纳米零价铁、PMS 的终浓度分别为 0.28 g/mL、10 mM、1 g/L、10 mM，捕获 15 分钟后测试，其 EPR 混合图谱和 TEMPO 加合物的模拟图谱分别见图 E.1 与 E.2。

$^1\text{O}_2$ 会氧化 TEMP，形成稳定加合物氮氧自由基 TEMPO。EPR 图谱，即为未成对电子与 1 个 N 核的相互作用而产生的超精细线。据二项式规则 (9.8.4)，N 核将谱线分裂为 3 个 ($I=1$, $2 \times 1 + 1 = 3$)。

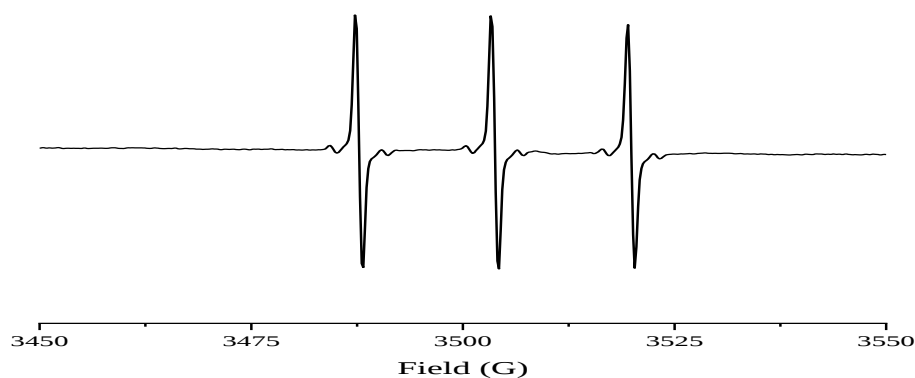


图 E.1 案例 EPR 混合谱图

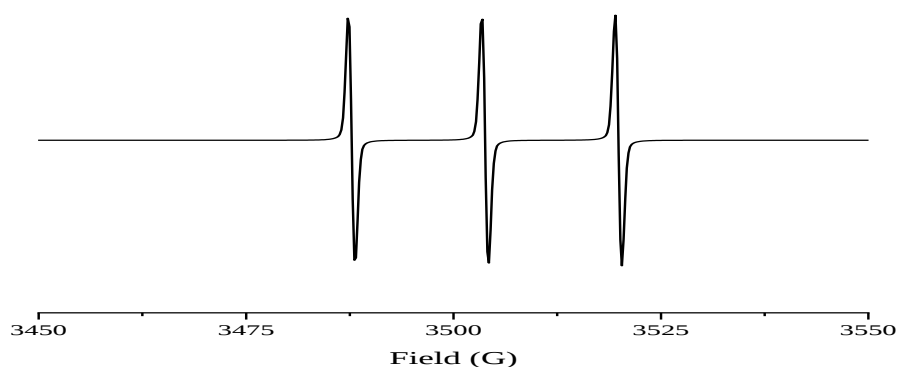


图 E.2 案例 TEMPO 的模拟谱图

注：图谱解析信息，3重峰， $g=2.0053$, $a_N=16.08$ G。

附录 F
(资料性)
谱仪设置参数

表 F.1 电子顺磁共振波谱仪案例设置参数

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)	中心磁场 (G)	微波频率 (GHz)	扫宽 (G)	扫描 次数	扫描时间 (s)
EPFRs	1.589	26	1	3503	9.822	100	1	40
DMPO-•OH	6.325	15	1	3505	9.838	150	1	40
DMPO-SO ₄ ⁻ •	6.325	15	1	3505	9.837	150	1	40
DMPO-O ₂ ⁻ •	6.325	15	1	3505	9.836	200	1	40
DMPO-OOH	6.325	15	1	3505	9.836	200	1	40
TEMPO	6.325	15	1	3503	9.836	100	1	40

注：表F.1中,主要仪器参数及设置注意事项。

- a) **微波功率** 未饱和时，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，两者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。为了避免饱和，建议测试样品前，设置不同微波功率或磁场-功率二维实验确认合适功率值。
- b) **调制幅度** 设置值应小于或等于峰-峰线宽。当出现平头峰时，应减小该值，且小于EPR谱峰中最细的一条的峰峰值。调制幅度越小，信噪比越差，分辨率越高。若其值设置过大，甚至会导致峰展宽严重，信号失真。
- c) **中心磁场** 检测土壤样品中EPFRs或污染土壤修复中反应产生的羟基自由基•OH、硫酸根自由基SO₄⁻•，以及超氧阴离子O₂⁻•、单线态氧!O₂等，若频率为9.8 GHz，则其中心磁场中心约为3500 G。在谐振腔中放入杜瓦等进样附件后，相应的频率下降至约为9.4 GHz，其磁场中心变为约3350 G。
- d) **微波频率** 频率指示微波的振荡，应与装入样品的谐振腔的频率保持一致，需确保其共振峰尖处于中心位置。
- e) **扫描范围** 设置100~200 G。
- f) **扫描次数** 增加扫描次数，有利于提升信噪比（S/N），噪声会被平均掉，而信号则会逐渐叠加。扫描次数为n，其信号增强n倍，其噪音增加 $\sqrt{n}$ 倍。综合样品的信号强度、噪音以及其自由基的稳定性等考虑谨慎选择多次扫描。
- g) **扫描时间** 扫描点数默认设置1024，扫描时间可设为20~60 s。