ICS 13.080
CCS Z 18

# T/SSSC

## 中 国 土 壤 学 会 团 体 标 准

T/SSSC XXXX—2025

# 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

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2025.07.09）

**在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。**

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

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 样品采集和预处理 ..... 4
5 方法原理 ..... 4
6 试剂和材料 ..... 5
7 仪器设备 ..... 5
8 标准和样品的制备 ..... 6
9 分析测试 ..... 8
10 质量控制 ..... 11
11 试验报告 ..... 11
附　录　A　（资料性）　EPFRs 的 EPR 图谱 ..... 13
附　录　B　（资料性）　DMPO-•OH 加合物的形成及 EPR 图谱 ..... 14
附　录　C　（资料性）　DMPO-$SO_4^{-\bullet}$加合物的形成及 EPR 图谱 ..... 15
附　录　D　（资料性）　DMPO-$O_2^{-\bullet}$加合物的形成及 EPR 图谱 ..... 16
附　录　E　（资料性）　TEMPO 加合物的形成及 EPR 图谱 ..... 17
附　录　F　（资料性）　TPC-$^1O_2$ 加和物的形成及 EPR 图谱 ..... 18
附　录　G　（资料性）　谱仪设置参数 ..... 19
参　考　文　献 ..... 20

# 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测定
# 电子顺磁共振波谱法

## 1 范围

本文件规定了土壤稳定自由基与土壤化学氧化修复中常见的活泼自由基，以及活性氧物质的电子顺磁共振波谱法（X-波段）的测定。

本文件描述的稳定自由基为土壤环境持久性自由基。

本文件描述的活泼自由基为土壤修复中羟基自由基、硫酸根自由基。

本文件描述的活性氧为土壤修复中超氧阴离子、单线态氧。

本文件也适用于环境等领域中相关自由基与活性氧的测定。

以10 mg 10 μg/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，本方法的检出限分别为：10.20 μg/g（$1.56\times10^{14}$ sp/mg）、0.35 μM（$2.11\times10^{11}$ sp/μL）,定量限分别为11.40 μg/g（$1.17\times10^{14}$ sp/mg）、0.60 μM（$3.61\times10^{11}$ sp/μL）。

## 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

GB/T 32722 土壤质量 土壤样品长期和短期保存指南

GB/T 42363 土壤质量 土壤理化分析样品的预处理

GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

JY/T 0579 电子顺磁共振谱方法通则

## 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

电子顺磁共振波谱（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

自由基是指具有不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。稳定自由基由于分子结构的特点很稳定，半衰期较长，可以稳定存在数分钟到几十天左右。如，土壤中环境持久性自由基（environment persistent free radicals, EPFRs）。而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。如，羟基自由基（HO•）。

3.3 **活性氧物质** reactive oxygen species

从生物学的角度看，被广泛研究的活性氧物质主要包括羟基自由基（HO•）、超氧阴离子（$O_2^{-\bullet}$）和单线态氧（$^1O_2$）。

3.4 **自旋捕获** spin trapping

用于短寿命自由基的测定，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，称为自旋加合物。常用的捕捉剂有DMPO（5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物）、BMPO（5-叔丁氧羰基-5-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

反映了分子内局部磁场的特征，是提供物质结构信息的重要参数。可反映未成对电子的基本信息，包括其类型与种类，自由基或过渡金属离子，所在的轨道信息及本位情况。

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称为超精细相互作用。

3.7 **超精细结构** hyperfine structure

由超精细相互作用产生的谱线称为超精细结构或超精细线。各项同性中超精细分裂耦合常数表示符号a，而各项异性中超精细张量用A表示，单位均为G或者mT。比如，NO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）称为自旋浓度。

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，灵敏度越高。

3.10 **线宽** line width

通常用两种方法来描述：一是指吸收曲线的半峰高处的半宽度；二是指一次微分线的峰-峰之间的宽度。符号$\Delta H_{pp}$表示，单位为G或mT。

## 4 样品采集和预处理

土壤样品的采集和保存、预处理分别参照GB/T 32722、GB/T 42363。

## 5 方法原理

电子顺磁共振是未配对电子在磁场中吸收电磁辐射，从低能级跃迁至高能级的现象。当电磁波的频率$v$可激发二个塞曼能级之间的跃迁，并且激发能量$hv$与未成对电子的能级之间间距$\Delta E$相匹配，即

$$\Delta E = hv = g\beta H \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

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

$v$ ——微波频率，单位为赫兹（Hz）；

$g$ ——$g$ 因子；

$\beta$ ——玻尔磁子，9.2740100783×$10^{-24}$，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）。

式（1）是电子顺磁共振的基本条件。一般EPR信号十分微弱，受激跃迁产生的吸收信号经数据采集处理系统可得到其共振一次微分谱线。

## 6 试剂和材料

### 6.1 标准样品

6.1.1 1，1-二苯基-2-苦基肼基（DPPH）：纯度≥99%。

6.1.2 锰标（$Mn^{2+}$）。

6.1.3 苯自由基络合物（BDPA）。

6.1.4 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基自由基（TEMPO）：纯度≥99%。

### 6.2 试剂

水为GB/T 6682 规定的一级水。

6.2.1 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物（DMPO）：纯度≥99%。

6.2.2 2,2,6,6-四甲基哌啶酮 盐酸盐（TEMP）：纯度≥99%。

注：注意TEMP的同系物（醇、酮）的溶解性及使用的pH范围。

6.2.3 2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-3-氨甲酰胺（TPC）：纯度≥99%。

6.2.4 硫酸亚铁（$FeSO_4 \cdot 7H_2O$）：纯度≥99.95%。

6.2.5 双氧水（$H_2O_2$，30%）：优级纯。

6.2.6 磷酸盐缓冲溶液（PBS，pH=7.4）：优级纯。

6.2.7 过硫酸钾（$K_2S_2O_8$）：纯度≥99%。

6.2.8 孟加拉玫瑰红 B：纯度≥80%。

6.2.9 甲醇（$CH_3OH$）：色谱纯。

6.2.10 二甲基亚砜（DMSO）：色谱纯。

注1：DMPO、TEMP、TPC应避光存于-20℃冰箱。

注2：其他溶液试剂避光、4℃保存。

### 6.3 材料

6.3.1 石英管：$\phi$3~4 mm，管长 12 cm。

6.3.2 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。

## 7 仪器设备

电子顺磁共振波谱仪，亦叫电子自旋共振波谱仪，具备X-波段与连续波扫描功能。

### 7.1 仪器的组成

EPR主要由微波桥、谐振腔、磁场系统、信号处理以及记录单元构成。

#### 7.1.1 微波桥

由微波源与检测微波辐射的器件构成。

#### 7.1.2 谐振腔

谐振腔通常呈矩形或圆柱形，是能与微波发生共振的金属盒子，可以把样品的弱信号放大。以Q因子来表征，可指示存贮微波能量的效率。若把样品放置于谐振腔的电场最小且磁场最大处，则其信号强度最大，谱仪的灵敏度也最高。

#### 7.1.3 磁场系统

由磁体、电源、控制器、磁感探头、微处理器构成。可准确控制磁场值与磁场扫描时间，并且调节电流以达准确的磁场。

#### 7.1.4 信号处理与记录单元

信号处理采用相敏检波技术，结合调制技术。吸收信号经数据采集处理系统可得到其信号的一次微分谱线，即为EPR谱。

### 7.2 仪器的检定

为了确保数据质量，应遵照仪器商提供的方法指南对波谱仪定期进行检定。

## 8 标准和样品的制备

### 8.1 标准与试剂的制备

8.1.1 DPPH **标准固体**: 以 KBr 为溶剂，配制 0、10、30、50、75、100 μg/g 系列浓度。

8.1.2 $Mn^{2+}$**或** BDPA **标准固体**: 若需要，可从市场购买。

8.1.3 TEMPO **标准溶液**: 在石蜡油中，配制 0、1、2、5、10、20 μM 系列浓度。

**注1**：分散于KBr中10~100 μg/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**：在溶剂石蜡油中较水的稳定性与信号强度更佳，建议使用石蜡油为溶剂。

**注3**：配制浓度范围可根据需求增减。

**注4**：也可购买市售的其他标准样品。

8.1.4 DMPO **溶液**: 用超纯水溶解至 1 M 或 2 M。参考终浓度：20~100 mM。

8.1.5 TEMP **溶液**: 用超纯水溶解至 1 M。参考终浓度：10~100 mM。

**注**：选购TEMP时，注意其同系物的溶解性及使用的pH范围。

8.1.6 TPC **溶液**: 用超纯水溶解至 1 M。参考终浓度：10~100 mM。

**注**：据实验对pH的需求，DMPO、TEMP、TPC等捕获试剂也可用PBS溶解。

8.1.7 $FeSO_4$ **溶液**: 以超纯水溶解，配制成 1 mM，稀释至 0.1 mM，现配现用。参考终浓度：10 μM。

8.1.8 $H_2O_2$ **溶液**: 以超纯水稀释，配制成 100 mM，稀释至 1 mM，现配现用。参考终浓度：100 μM。

8.1.9 PBS **缓冲溶液**: 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。

8.1.10 $K_2S_2O_8$ **溶液**: 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。

8.1.11 **孟加拉玫瑰红 B 溶液**: 以超纯水溶解，配制成 10 mM。参考终浓度：1 mM。

8.1.12 **甲醇溶液**: 参考终体积百分数：≥90%。

8.1.13 DMSO **溶液**: 参考终体积百分数：≥90%。

**注**：以上制备溶液，应避光、低温保存，并及时使用。

### 8.2 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（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。

### 8.3 羟基自由基 HO•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•，其主要反应式为：

$$\mathrm{EPFRs} + \mathrm{H_2O_2} \rightarrow \mathrm{HO\bullet} + \mathrm{H_2O} \quad \cdots\cdots (2)$$

$$\mathrm{Fe^{2+}} + \mathrm{H_2O_2} \rightarrow \mathrm{Fe^{3+}} + \mathrm{HO\bullet} + \mathrm{OH^-} \quad \cdots\cdots (3)$$

$$\mathrm{HO\bullet} + \mathrm{DMPO} \rightarrow \mathrm{DMPO{-}\bullet OH} \quad \cdots\cdots (4)$$

常用捕获剂 DMPO 溶液捕获产生的羟基自由基 HO•，生成寿命较长并且比较稳定的自旋加合物DMPO-•OH。以芬顿反应体系为测试案例，其制备信息见附录 B。

### 8.4 硫酸根自由基$SO_4^{-\bullet}$的产生及制备

活化过硫酸盐体系可产生$SO_4^{-\bullet}$与HO•，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$SO_4^{-\bullet}$。通用反应式可表示为：

$$\text{过硫酸盐} + \text{活化剂} \rightarrow \mathrm{SO_4^{-\bullet}} + \mathrm{HO\bullet} + \text{活化产物} \quad \cdots\cdots (5)$$

$$\mathrm{SO_4^{-\bullet}} + \mathrm{H_2O} \rightarrow \mathrm{HO\bullet} + \mathrm{SO_4^{2-}} \quad \cdots\cdots (6)$$

$$\text{过硫酸盐} + \text{热/电/光等} \rightarrow \mathrm{SO_4^{-\bullet}} + \mathrm{HO\bullet} \quad \cdots\cdots (7)$$

$$\mathrm{HO\bullet} + \mathrm{DMPO} \rightarrow \mathrm{DMPO{-}\bullet OH} \quad \cdots\cdots (8)$$

$$\mathrm{SO_4^{-\bullet}} + \mathrm{DMPO} \rightarrow \mathrm{DMPO} - \mathrm{SO_4^{-\bullet}} \quad \cdots\cdots (9)$$

在水体系中，捕获剂DMPO溶液可同时捕获HO•、$SO_4^{-\bullet}$，生成寿命较长且较稳定的自旋加合物DMPO-•OH 与DMPO-$SO_4^{-\bullet}$；若在DMSO等试剂中，由于HO•被淬灭，可获得DMPO-$SO_4^{-\bullet}$图谱。以光照过硫酸盐反应体系为测试案例，其制备信息见附录C。

### 8.5 超氧阴离子$O_2^{-\bullet}$的产生及制备

在合成催化剂、新型材料活化过硫酸盐、矿物反应体系中，可产生活性物质为$O_2^{-\bullet}$，进而实现对土壤有机污染物的降解。

$$\text{过硫酸盐} + \text{活化剂} \rightarrow \mathrm{O_2^{-\bullet}} + \text{活化产物} \quad \cdots\cdots (10)$$

$$\mathrm{Fe^{2+}} + \mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{O_2^{-\bullet}} + \mathrm{Fe^{3+}} \quad \cdots\cdots (11)$$

$$\mathrm{O_2^{-\bullet}} + \mathrm{DMPO} \rightarrow \mathrm{DMPO} - \mathrm{O_2^{-\bullet}} \quad \cdots\cdots (12)$$

$$\mathrm{DMPO} - \mathrm{O_2^{-\bullet}} + \mathrm{H_2O} \rightarrow \mathrm{DMPO} - \mathrm{OOH} \quad \cdots\cdots (13)$$

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$O_2^{-\bullet}$，生成寿命较长并且比较稳定的自旋加合物DMPO-$O_2^{-\bullet}$，也可能被质子化后生成DMPO-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 $^1O_2$ 的产生及制备

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。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$^1O_2$来实现对污染土壤的修复。其反应机理主要为：

$$玫瑰红 + 光照（550\ nm） \rightarrow 玫瑰红* \cdots\cdots (14)$$

$$玫瑰红* + O_2 \rightarrow 玫瑰红 + {}^1O_2 \cdots\cdots (15)$$

$$活化剂 + 过硫酸盐 \rightarrow {}^1O_2 + 活化产物 \cdots\cdots (16)$$

$$TEMP + {}^1O_2 \rightarrow TEMPO \cdots\cdots (17)$$

$$TPC + {}^1O_2 \rightarrow TPC - {}^1O_2 \cdots\cdots (18)$$

捕获剂TEMP或TPC溶液捕获单线态$^1O_2$，生成寿命较长且较稳定的自旋加合物TEMPO、TPC-$^1O_2$。以光照过硫酸盐与孟加拉玫瑰红反应体系为测试案例，其制备信息见附录E与F。

注1：8.3~8.6中，通常现场开展捕获，并及时测试。

注2：反应体系各物质终浓度亦可根据实际结果自行进行增减。

注3：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）。

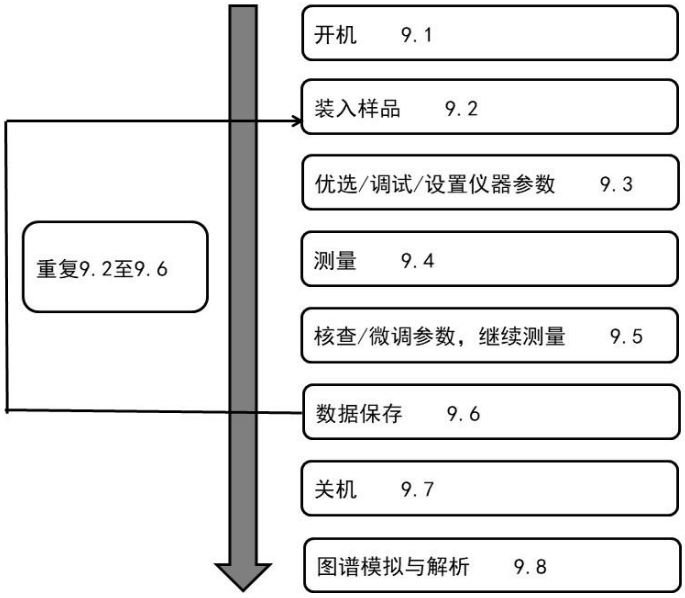



图1 EPR分析测试主要步骤

### 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。

### 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6.3.1样品管中，需确保样品堆积紧实，使其高度约1.5 cm即可。

毛细管6.3.2吸入溶液样品、硅脂封下端口，且高度应小于4 cm，再放置于6.3.1样品管（ $\phi$3 mm）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

### 9.3.1 微波功率

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，EPR信号强度与功率平方根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。

注：为了避免微波功率饱和，建议设置不同微波功率或磁场-功率二维实验确认功率值。

### 9.3.2 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，需确保其共振峰峰尖处于中心位置。

### 9.3.3 相位

调试微波的相位，确保峰形尽量对称。

### 9.3.4 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中，可采用微调按钮自动调试。

### 9.3.5 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HO•、硫酸根自由基$SO_4^{-\bullet}$，以及超氧阴离子$O_2^{-\bullet}$、单线态氧$^1O_2$等，若频率为9.8 GHz，则其中心磁场中心约为3500 G。

注：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，其磁场变为约3350 G。

### 9.3.6 扫描范围

通常设置100~200 G。

### 9.3.7 扫描时间

设置参数与扫描点数相关，可对应地作调整。扫描点数默认设置1024，则扫描时间可设为20~60 s。

### 9.3.8 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，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。

注：根据具体样品的信号强度、噪音以及其自由的稳定性等谨慎选择多次扫描。

### 9.3.9 调制幅度

默认设置为1。应设置为小于或等于峰-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（Gauss）。调制幅度越小，信噪比越差，分辨率越高。若其值过大，甚至会导致峰展宽严重，信号失真。

### 9.3.10 调制频率

默认设置100 KHz。但是对于特别细的EPR信号，或峰峰间距特别近的情况调制频率应调小，才能将所有的谱峰都分辨出来。

### 9.3.11 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。

## 9.4 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。

注：为了确保数据结果的可比性，建议样品的制备和仪器参数设置应严格保持一致。

### 9.5 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。

### 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

测试完成后，遵照仪器操作规程关闭仪器。确保微波衰减功率大于30 dB条件下，仪器由运行调至调谐状态，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，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

既可在仪器连接电脑上进行，又可自行采用行业内常用的模拟软件解析数据。模拟图谱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

可由直接测量法和比较法获取。

（1）直接测量法

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。

$$g = 714.47735 \times \frac{\nu}{B_0} \quad \cdots\cdots (19)$$

式中：

$\nu$——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磁场并自动完成 $g$ 值的计算。

（2）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：

$$\nu = \frac{g_S \beta B_S}{h} = \frac{g_x \beta B_x}{h} \quad \cdots\cdots (20)$$

$$g_x = \frac{g_S B_S}{B_x} \quad \cdots\cdots (21)$$

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-$SO_4^{-\bullet}$、DMPO-$O_2^{-\bullet}$、DMPO-OOH、TEMPO，其g 因子通常约为2.005~2.006。

#### 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$\Delta m_s=\pm1$与$\Delta m_I=0$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-•OH、DMPO-$SO_4^{-\bullet}$、DMPO-$O_2^{-\bullet}$、TEMPO、TPC-$^1O_2$案例的超精细分裂历程，详见附录B~F。

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8.1.1~8.1.3，且不少于5个点，根据标准溶液EPR谱线面积与已知自旋浓度的线性关系，可计算出样品的自旋浓度。标准曲线的线性相关系数应≥0.999。这种将测定未知样品的积分面积与已知标准品的面积进行比较，从而对未知样品的自旋数进行定量的方法，称为相对法。

（B）绝对法

EPR积分信号涉及微波功率、磁场、调制幅度、转换时间、点数、放大倍数等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。此方法被称为绝对法。计算电子自旋数与样品质量或体积之比，获得自旋浓度。

## 10 质量控制

### 10.1 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扫描测试。

### 10.2 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。自旋浓度则参照9.8.5部分内容。

注1：DPPH固体（单晶）样品呈单峰，g=2.0036±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±0.0002）与第4峰（g=1.9803±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，单峰，g=2.00254±0.00032。

注4：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。

### 10.3 精密度

必要时，设置平行性实验。相对标准偏差应≤10 %。

## 11 试验报告

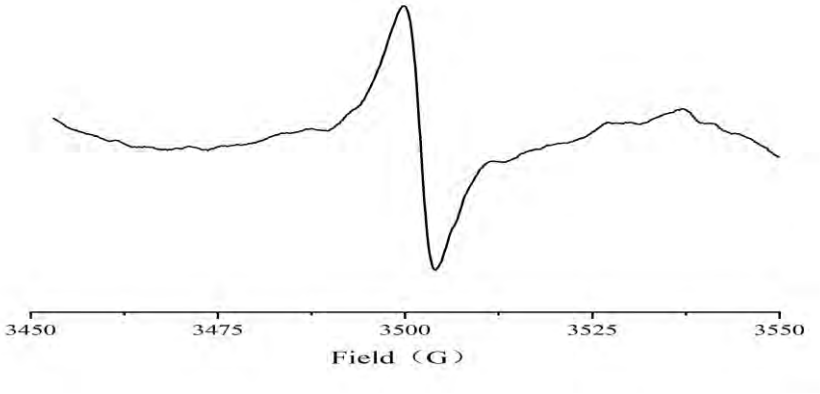
至少包含以下内容：

a) 文件编号；
b) 样品制备信息；
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。



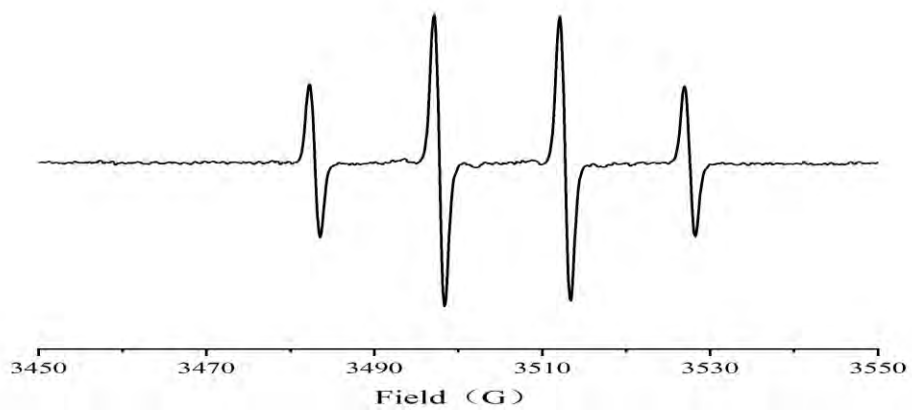

图A.1 土壤EPFRs案例EPR图谱

解析信息：单峰，g=2.0033

# 附 录 B
（资料性）
DMPO-•OH 加合物的形成及 EPR 图谱

芬顿反应体系测试案例中，DMPO、$Fe^{2+}$、$H_2O_2$终浓度分别为100 mM、0.01 mM、0.1 mM，其DMPO-•OH加合物图谱见图B.1。

DMPO是一个环状吡咯酮衍生物，在捕获自由基反应中，HO•自由基进攻$C_\alpha$=N双键上的$C_\alpha$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=1，2×1+1=3），$H_\beta$将进一步分裂为2个（I=1/2，2×1/2+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：



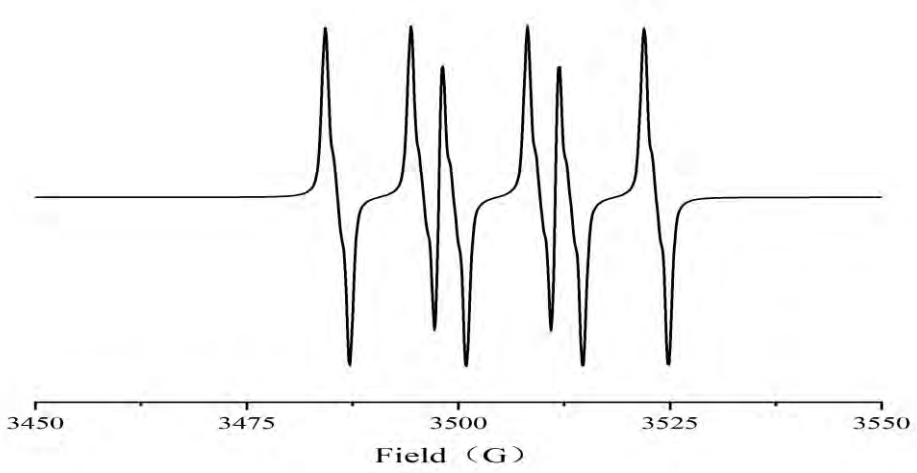

图B.1 DMPO-•OH案例EPR谱图

解析信息：4重峰，g=2.0053，$a_N$=14.98 G，$a_H$=14.72 G

# 附 录 C
（资料性）
DMPO-$SO_4^{-\bullet}$加合物的形成及 EPR 图谱

汞灯光照过硫酸钾反应测试案例中，DMPO、PMS终浓度分别为100 mM、10 mM，其DMPO-$SO_4^{-\bullet}$加合物图谱见图C.1。

DMPO是一个环状吡咯酮衍生物，在捕获自由基反应中，$SO_4^{-\bullet}$自由基进攻$C_\alpha$=N双键上的$C_\alpha$原子，形成稳定加合物DMPO-$SO_4^{-\bullet}$。EPR图谱，即为未成对电子与1个N核、1个$H_\beta$核，也容易质子化而引入一或二个弱耦合的$H_\gamma$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），$H_\beta$将进一步分裂为2个（I=1/2，2×1/2+1=2），由于$a_N > a_H$，DMPO-$SO_4^{-\bullet}$的图谱峰经$H_{\gamma1}$裂为6×2=12峰，再经$H_{\gamma2}$分裂12×2=24且中间两两重叠，最后呈现18重峰。图谱如下：



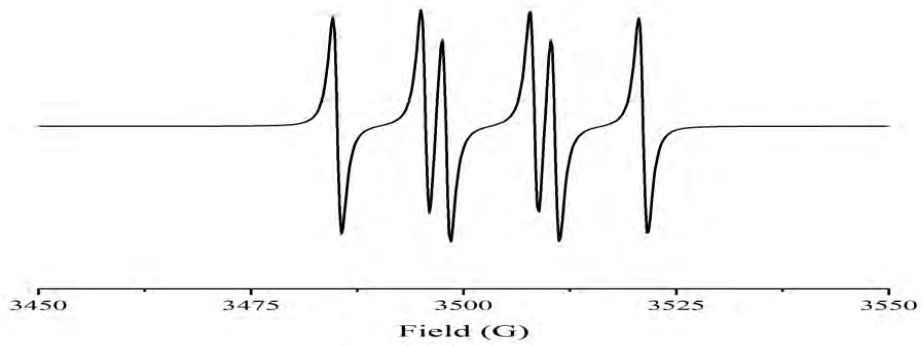

图C.1 DMPO-$SO_4^{-\bullet}$案例EPR模拟谱图

解析信息：18重峰, g=2.0055, $a_N$ =13.76 G, $a_{H\beta}$=10.23 G, $a_{H\gamma1}$=1.38 G, $a_{H\gamma2}$=0.84 G

# 附 录 D
（资料性）
DMPO-$O_2^{-\bullet}$加合物的形成及 EPR 图谱

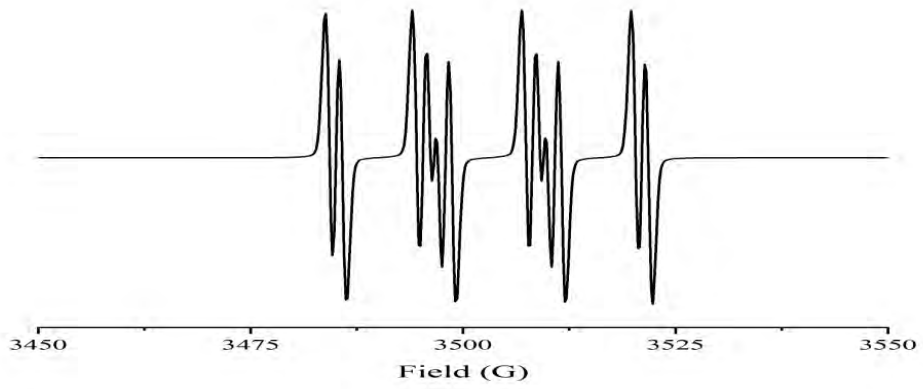
光照活化纳米颗粒CdS-NP反应体系测试案例中，在90%（v/v）DMSO中，DMPO、CdS-NP终浓度分别为200 mM、1 g/L，其DMPO-$O_2^{-\bullet}$及DMPO-OOH加合物的形成及EPR图谱见图D.1/D.2。

DMPO是一个环状吡咯酮衍生物，捕获$O_2^{-\bullet}$后，生成加合物DMPO-$O_2^{-\bullet}$。在捕获自由基反应中，$O_2^{-\bullet}$自由基进攻$C_\alpha$=N双键上的$C_\alpha$原子，形成稳定加合物DMPO-$O_2^{-\bullet}$。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），$H_\beta$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-$O_2^{-\bullet}$通常易被$H_\gamma$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 DMPO-$O_2^{-\bullet}$ 案例EPR模拟谱图

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



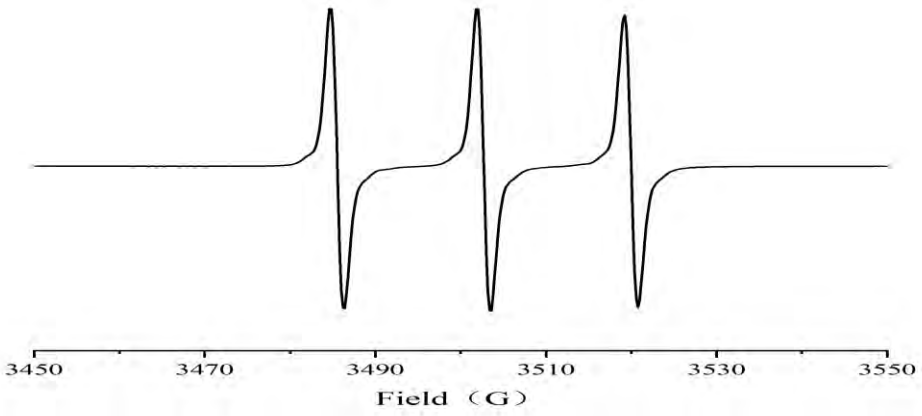

图D.2 DMPO-OOH 案例EPR模拟谱图

解析信息：12重峰, g=2.0066, $a_N$ =12.89 G, $a_{H\beta}$=10.23 G, $aH_{\gamma 1}$=1.44 G

# 附 录 E
（资料性）
TEMPO 加合物的形成及 EPR 图谱

纳米零价铁包覆碳复合材料反应体系测试案例中，TEMP、Fe@C800、PMS终浓度分别为10 mM、0.2 g/L、10 mM，其TEMPO加合物的形成及EPR图谱见图E.1。

$^1O_2$进攻$C_\alpha$=N双键上的$C_\alpha$原子，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=1，2×1+1=3）。



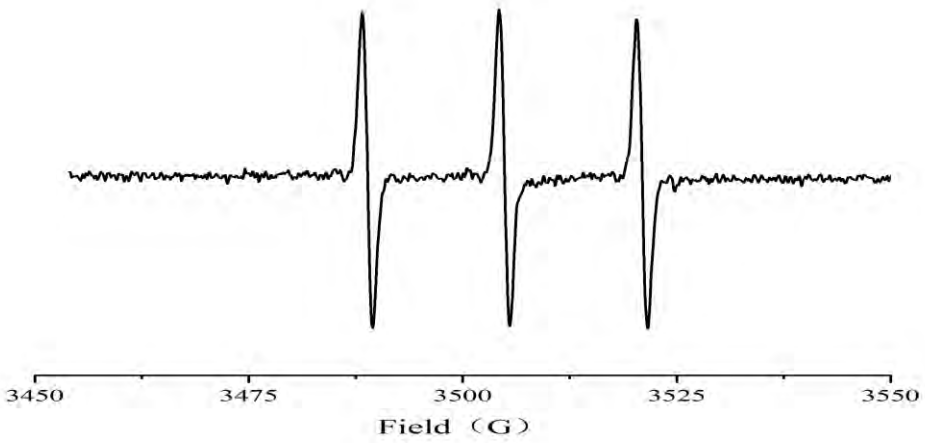

图E.1 TEMPO案例EPR谱图

解析信息：3重峰， g=2.0063，$a_N$=17.23 G

# 附 录 F
（资料性）
TPC-$^1O_2$加和物的形成及 EPR 图谱

紫外光照孟加拉玫瑰红反应体系测试案例中，TPC、孟加拉玫瑰红、PBS终浓度分别为100 mM、5 mM、12.5 mM，其中TPC-$^1O_2$的形成及EPR图谱见图F.1。

$^1O_2$进攻$C_\alpha$=N双键上的$C_\alpha$原子，形成稳定加合物氮氧自由基TPC-$^1O_2$。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=1，2×1+1=3）。




图F.1 TPC-$^1O_2$案例EPR谱图

解析信息：3重峰， g=2.0054 G，$a_N$=16.05 G

# 附 录 G
（资料性）
谱仪设置参数

电子顺磁共振波谱仪案例设置参数表G.1

| 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) |
| EPFRs | 1.589 | 26 | 1 | 3503 | 9.822 | 100 | 1 | 40 |
| DMPO-•OH | 6.325 | 15 | 1 | 3505 | 9.838 | 150 | 1 | 40 |
| DMPO-$SO_4^{-\bullet}$ | 6.325 | 15 | 1 | 3505 | 9.837 | 150 | 1 | 40 |
| DMPO-$O_2^{-\bullet}$ | 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 |
| TPC-$^1O_2$ | 20.000 | 10 | 1 | 3504 | 9.837 | 100 | 1 | 30 |

# 参 考 文 献


1. Albert Leo N Dela Cruz, Robert L Cook, Barry Dlliner,et al. Assessment of environmentally persistent free radicals in soils and sediments from three superfund sites[J]. Environment Science Process Impacts, 2014, 16(1): 44-52.
2. Albert Leo N Dela Cruz, William Gehlin, Slawomir Lomnicki, et al. Detection of environmentally persistent free radicals at a superfund wood treatin site[J]. Environment Science Technoloy, 2011, 45: 6356.
3. Delliner B, Lomnicki S, Khacharyan L, et al． Formation and stabilization of persistent free radicals[J]. Proceedins of the Combustion Institute International Symposium on Combustion, 2007, 31(1): 521-528.
4. Guodong Fang, Changying Zhu, Dionysiou D D, et al． Mechanism of hydroxyl radical generation from biochar suspensions:Implications to diethyl phthalate degradation[J]. Bioresource Technoloy, 2015, 176: 210-217.
5. Hanzhong Jia, Gulimire Nulaji, Hongwei Gao, et al. Formation and stabilization of environmentally persistent free radicals induced by the interaction of anthracene with Fe(III)-modified clays[J]. Environment Science Technology, 2016, 50: 6310-6319.
6. Hanzhong Jia, Song Zhao, Yafang Shi, et al. Transformation of PAHs and formation of environmentally persistent free radicals on modified montmorillonite: the role of surface metal ions and PAHs molecular properties[J]. Environment Science Technology, 2018, 52(10): 5725-5733.
7. Hanzhong Jia, Song Zhao, Yafang Shi,et al. Formation of environmentally persistent free radicals during the transformation of anthracene in different soils: Roles of soil characteristics and ambient conditions[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 362(11): 214-223.
8. Marina Brustolon and Elio Giamello. Electron paramagnetic resonace: A Practioner' Toolkit[M]. John Wiley and Sons, INC., publication, New Jersey, 2009.
9. Pignatello J J, Oliveros E, MacKay A. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2006, 36(1): 1-84.
10. Qianqian Yu, Ling Feng, Xinna Chai, et al. Enhanced surface Fenton degradation of BPA in soil with a high pH[J]. Chemosphere, 2019, 220: 335-343.
11. VejerAno E, Lomnicki S, Dellinger B. Formation and stabilization of combustion generated environmentally persistent free radicals on an $Fe(III)_2O_3$ /silica surface[J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45(2): 589-594.
12. Weil, John A, Bolton J R, et al. Elctron Paramagnetic Resonance, Elementary Theory and Practical Applications[M].Wiley-Inter-science, New York,1994.
13. Meiying Huang, Cun Liu, Peixin Cui,et al. Facet-Dependent Photoinduced Transformation of Cadmium Sulfide (CdS) Nanoparticles[J]. Environmental Science and Technology. 2021, 55 (19): 13132-13141.
14. Lei Yang, Jianing Shen, Wenying Zhang, et al. Hydrothermally assisted synthesis of nano zero-valent iron encapsulated in biomass-derived carbon for peroxymonosulfate activation: The performance and mechanisms for efficient degradation of monochlorobenzene. Science of The Total Environment, 2022, 829, 154645.
15. 国家教育委员会. 电子顺磁共振谱方法通则: JY/T 0579-2020[S]. 北京: 科学技术文献出版社, 2020.
16. 蒋倩，唐昊冶，刘云，等. 基于电子顺磁共振波谱法的土壤环境持久性自由基的检测方法研究[J]. 土壤，2023, 55(2): 379-389.
17. 卢超，郑祥民，周立旻，等. 城市大气颗粒物表面半醌自由基的测定及特征分析[J]. 环境化学, 2013, 32(1) : 1-6.
18. 苏吉虎, 杜江峰. 电子顺磁共振波谱:原理和应用[M]. 北京：科学出版社，2022.
19. 卢景雰. 现代电子顺磁共振波谱学及其应用[M]. 北京: 北京大学医学出版社，2012.
20. 裘祖文. 电子顺磁共振波谱[M]. 北京：科学出版社，1980.

21. 阮秀秀，杜巍萌，郭凡可，等. 环境持久性自由基的环境化学行为[J]. 环境化学，2018, 37(8): 1780-1788.
22. 张若瑄，王朋，张绪超，等. 土壤中环境持久性自由基的形成与稳定及其影响因素[J]. 化工进展, 2020, 39(4): 1528-1538.