科学通报 2021 年 第 66 卷 第 20 期: 2596 ~ 2607
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

土壤胡敏素的自由基特性、氧化还原性及其影响因素

石亚芳[1], 刘子雯[1], 代允超[1], 贾汉忠[1,2*], 祝凌燕[1,2]

1. 西北农林科技大学资源环境学院, 杨凌 712100;
2. 西北农林科技大学水土保持研究所, 黄土高原土壤侵蚀与旱作农业国家重点实验室, 杨凌 712100

* 联系人, E-mail: jiahz@nwafu.edu.cn

2020-08-02 收稿, 2020-09-18 修回, 2020-10-10 接受, 2020-10-15 网络版发表
国家自然科学基金(41877126)资助

摘要 采用电子顺磁共振波谱技术研究了10种代表性土壤胡敏素中持久性自由基(persistent free radicals, PFRs)的类型与浓度. 结果表明10种土壤提取的胡敏素中均检测到PFRs, 浓度范围为0.11×10^{16}~5.79×10^{16} spins/g, 其g因子均<2.0030, 属于以碳为中心的“芳香族”类自由基. 傅里叶变换衰减全反射红外光谱、紫外可见漫反射光谱及酸性基团分析表明, 胡敏素的芳香结构有利于PFRs的形成, 且PFRs浓度与酚羟基含量呈负相关关系(P<0.05), 但与羧基含量呈正相关关系(P<0.05). 自旋捕获法测定了胡敏素诱导产生活性氧物种(reactive oxygen species, ROS)的能力, 10种胡敏素中均检测到超氧自由基(平均浓度达5.25×10^{13} spins/g), 仅在部分样品(如红壤、黑土、栗钙土和褐土提取的胡敏素)中检测到羟基自由基. 通过二硫苏糖醇(DTT)和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)方法测定了胡敏素的氧化还原性, 其氧化能力范围为24~376 nmol/(min g), 还原能力IC_{50}的范围为0.19~1.83 g/mL. 相关分析结果表明, 胡敏素的氧化能力与其促使产生ROS的性能直接相关, 而酚羟基是其还原能力的主要贡献基团. 进一步以双酚A(BPA)为目标污染物, 研究了不同来源胡敏素促使BPA转化的性能. 结果显示, BPA去除率与胡敏素氧化能力呈正相关关系(P<0.05), 而氧化能力与ROS呈正相关关系(P<0.05), 证实了ROS对BPA去除率的贡献. 这些结果为评价不同类型土壤中胡敏素的生态环境效应提供了理论依据.

关键词 胡敏素, 持久性自由基, 活性氧自由基, 氧化还原能力

腐殖质(humic substance, HS)作为土壤有机质中最重要的组分, 是一种结构复杂、无定形的多聚物. 依照HS在酸碱条件下的溶解性可分为胡敏酸、富里酸和胡敏素3种组分[1]. HS作为具有氧化还原活性的天然有机大分子物质, 在土壤修复过程中具有巨大的应用潜力[2], 因而受到人们的广泛关注. 然而, 关于HS氧化还原活性的研究主要集中在HS中的可溶性组分(腐殖酸和富里酸)及其醌类化合物上[2,3], 关于HS中的不溶性组分(胡敏素)在环境中作用的研究仅限于其对各种化学物质的吸附[4,5], 对胡敏素的氧化还原性仍知之甚少. 而胡敏素具有相对较高的分子量、较大的脂族性和芳香度、较少的甲氧基碳、羰基碳、木质素类化合物和酚类化合物[6], 这使得胡敏素易与土壤中重金属、疏水性有机污染物, 以及无机矿物发生键合和吸附作用[7], 从而调控营养元素的生物化学循环和有机污染物的迁移转化过程. 因此, 充分理解胡敏素的氧化还原性及结构特征对明确土壤中营养物质的利用效率及污染物的环境归趋具有重要意义.

早在20世纪60年代, Rex[8]首次揭示了HS在常温常压下带有稳定的顺磁信号, g因子在2.0025~2.0050, 是

引用格式: 石亚芳, 刘子雯, 代允超, 等. 土壤胡敏素的自由基特性、氧化还原性及其影响因素. 科学通报, 2021, 66: 2596–2607
Shi Y F, Liu Z W, Dai Y C, et al. Free radical property, redox capacity, and the relevant influencing factors of soil humin (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 2596–2607, doi: 10.1360/TB-2020-0965

© 2020《中国科学》杂志社

一类寿命较长的有机自由基，后被定义为持久性自由基(persistent free radicals, PFRs). 作为一类新型环境风险物质，前人已经证实PFRs在环境暴露引起的疾病中的主导作用，以及PFRs能引起比环境介质本身更强的生物活性和毒性[9]. PFRs的毒性源于其反应活性，其可促使活性氧自由基(ROS)的产生. 这些ROS具有很强的反应性，不仅能诱导生物体发生氧化应激反应，还可促使污染物发生转化降解[10]. 有研究[11]报道土壤中的PFRs可以通过电子转移促使氨基甲酸酯类农药发生降解. 污泥中提取的腐殖质(HS)中的半醌类自由基具有较高的氧化还原电位，可以将电子传递给Fe(III)生成Fe(II)[12]. Xu等人[13]发现胡敏素中的PFRs可以诱导产生ROS，促进Cr(VI)还原成Cr(III).

Saab和Martin-Neto[14]发现全土上的PFRs与胡敏素上的PFRs呈正相关关系(R^2=0.91)，证实胡敏素是土壤中PFRs的主要载体. 本课题组[15]之前的研究也发现，从泥炭土中分离出的胡敏素中PFRs浓度(8.6×10^{16} spins/g)远远高于腐殖酸(2.0×10^{16} spins/g)和富里酸(4.6×10^{16} spins/g). 因此，我们选择胡敏素为研究对象. 其次，不同来源胡敏素的生物地球化学过程不同，其分子结构及含有的活性基团(如羧基、酚基、酮基等)相对浓度也不同，PFRs特性存在较大差异，其氧化还原能力也不尽相同[16]. 但目前对不同土壤中胡敏素结构特征与PFRs的相关关系仍知之甚少，对胡敏素自由基特性与其氧化还原能力的关系尚不明确.

鉴于此，本研究采用傅里叶变换衰减全反射红外光谱法(attenuated total reflection flourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR)、紫外可见漫反射(ultraviolet-visible, UV-Vis)及化学滴定法研究了胡敏素的化学和结构特征；采用电子顺磁共振波谱(electron paramagnetic resonance, EPR)研究了胡敏素的PFRs的类型、丰度及其反应活性；测定了不同来源土壤胡敏素的氧化还原能力，同时选取土壤中常见污染物双酚A(BPA)[17,18]为目标物，研究了不同来源土壤胡敏素对其转化的性能. 在此基础上，结合数理统计方法，阐明胡敏素的结构特征与PFRs、ROS、氧化还原能力及BPA去除率之间的关系，为明确胡敏素在土壤环境中的化学行为及环境效应提供有效的科学依据与理论支持.

1 实验

(ⅰ) 胡敏素的提取与纯化. 共采集我国10个省份的0~20 cm的耕作层土壤样品：江西红壤、安徽棕壤、山西褐土、吉林黑土、内蒙古栗钙土、新疆漠土、河南潮土、甘肃灌淤土、天津盐碱土、重庆岩性土. 随后，将土壤样品在常温下自然风干，研磨后过2 mm筛密封备用. 土壤有机碳含量采用重铬酸钾外加热法测定[19]. 胡敏素的提取参照国际腐殖酸协会标准固态提纯方法[15]，即将20 g土壤样品加入到含有200 mL 0.1 mol/L $Na_2P_2O_7$的聚乙烯瓶中，并向容器中通入氮气. 充分混合后，以120 r/min的速度震荡过夜. 处理后的样品经离心分离，弃去上清液，向沉淀中加入200 mL 0.1 mol/L NaOH溶液，振荡4 h，静置12 h后再次离心分离后，弃去上清液. 上述方法重复6次后，将沉淀物悬浮在0.1 mol/L HCl和0.3 mol/L HF(v:v=1:1)的200 mL混合溶液中，震荡过夜，去除无机成分. 经去离子水多次洗涤至溶液中无氯离子且达到中性时，弃去上清液，将沉淀部分经冷冻干燥后置于真空干燥器中储存备用. 利用电子顺磁共振波谱法测定PFRs. 前人研究已证实标准提纯方法不会影响胡敏素中PFRs浓度[20]，酸碱滴定法测定胡敏素中总含氧酸性基团和羧基含量，由差减法算得酚羟基的含量[21]，不同类型土壤及胡敏素基本理化性质见表1.

(ⅱ) 胡敏素样品分析与表征. 光谱学性质表征：ATR-FTIR光谱在Bruker Vertex 70上测定，光谱记录范围为4000~400 cm^{-1}，分辨率为4 cm^{-1}，扫描64次. 用Omnic 8.2软件对FTIR谱图作一级基线校正和标准化处理的基础上，对谱线选取特征峰，求得各主要吸收峰的吸收强度，对相应的官能团进行定量化计算. 固体紫外漫反射在日本岛津UV-2600上完成，光谱记录范围为200~800 nm. 在254 nm处测定吸光度，记为$SUVA_{254}$；在465和665 nm处分别测定吸光度，记为E_4和E_6，并计算E_4/E_6值.

PFRs检测：称取50 mg胡敏素样品于石英管中，直接在电子顺磁共振波谱仪(Bruker EMXmicro-6/1/P/L，德国)上测定，仪器工作参数设置如下：X波段微波频率9.7 GHz、微波功率2.02 mW、中心磁场3470 G、调制振幅4.0 G、扫描宽度200 G、扫描时间30 s、扫描3次.

ROS测定：称取20 mg胡敏素样品于样品管中，加入200 μL 0.1 mol/L 5,5-二甲基-1-吡咯啉-*N*-氧化物(DMPO)的水溶液. 混合后，涡旋震荡1 min，用0.45 μm滤膜过滤. 滤液转移到毛细管中，用真空油脂密封. 随后，将毛细管装入石英管中，在室温下测定自旋加合物的浓度. 用二甲基亚砜(DMSO)溶液溶解的DMPO测定超氧自由基，具体步骤同上. EPR测量参数如下：中心磁

表 1 从不同类型土壤提取胡敏素的基本理化性质

Table 1 The physical and chemical properties of humin from different soils

土壤类型	采样点	经纬度	土壤主要组分		胡敏素元素组成及基团含量				
			有机碳 (g/kg)	黏粒(%)	碳(%)	氮(%)	含氧酸性基团 (mmol/g)	羧基 (mmol/g)	酚羟基 (mmol/g)
红壤	江西	28°12′N 116°56′E	6.78	36.51	38.75	2.72	2.39	0.20	2.19
棕壤	安徽	31°55′N 117°11′E	11.62	16.84	22.94	2.40	2.99	0.18	2.81
褐土	山西	37°22′N 112°28′E	13.44	17.74	56.11	5.86	0.76	0.37	0.39
黑土	吉林	43°31′N 124°48′E	19.05	30.18	50.22	4.77	1.36	0.27	1.09
栗钙土	内蒙古	41°33′N 110°01′E	9.45	10.51	23.25	2.88	2.66	0.29	2.37
漠土	新疆	43°56′N 87°16′E	11.27	9.57	31.62	3.44	2.71	0.16	2.55
潮土	河南	35°00′N 113°41′E	10.32	18.18	34.41	3.13	1.46	0.14	1.32
灌淤土	甘肃	38°52′N 100°26′E	11.18	6.66	23.56	2.57	2.82	0.17	2.65
盐碱土	天津	38°45′N 117°06′E	12.77	7.59	31.93	3.46	3.39	0.26	3.13
岩性土	重庆	29°48′N 106°24′E	10.14	24.96	25.42	2.18	3.78	0.23	3.55

场3500 G、微波功率20 mW、扫描宽度200 G、扫描时间30 s/次、扫描15次. 用SpinFit模拟EPR谱图, 对样品PFRs和ROS进行定性定量分析.

氧化能力与还原能力的测定: 采用二硫苏糖醇(DTT)法[22]表征胡敏素的氧化能力. 称取5 mg胡敏素样品, 将其分散于9.8 mL 0.05 mol/L的磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中, 于37°C条件下反应5 min, 随后加入200 μL 1 mmol/L DTT, 在37°C恒温槽中持续震荡. 每隔10 min取400 μL的混合样品, 随后加入20 μL 1 mmol/L二硫二硝基苯甲酸(DTNB), 使用紫外-可见分光光度计(Thermo Scientific, 美国)测定412 nm处的吸光度, 以确定剩余DTT的浓度, 空白实验(不加胡敏素)和控制实验(加胡敏素)同时进行. 单位质量样品对DTT的消耗速率即为氧化能力(oxidative potential, OP^{DTT}), 单位为nmol/(min g), 计算公式如下:

$$o'DTT = -o'Abs \times \frac{N_0}{Abs_0}, \tag{1}$$

$$OP^{DTT} = \frac{o'DTTs - o'DTT_b}{\frac{V_a}{V_e} \times m}, \tag{2}$$

式中, o′Abs为412 nm处吸光度与反应时间做线性回归的斜率; Abs_0为吸光度与反应时间作线性回归的截距, 即计算出的初始吸光度; N_0为加入DTT的初始摩尔数; o′DTT_s和o′DTT_b分别是控制实验和空白实验清除DTT的速率(nmol/min); V_e和V_a分布代表提取体积及反应液中所加入体积(mL); m为所称取样品质量(g).

采用1,1-二苯基-2-三硝基苯(DPPH)法测定胡敏素的还原能力[23]. 量取0.1 mL胡敏素溶液(100~1000 μg/mL)置于10 mL玻璃管中, 随后加入6 mL 50 μg/mL的DPPH溶液, 遮光后置于旋转反应器上, 于室温下反应40 min, 过0.45 μm的滤膜后于紫光可见分光光度计上测定515 nm处的吸光值, 对DPPH的清除速率(IP, %)计算公式如下:

$$IP(\%) = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100, \tag{3}$$

式中, A_0为未反应时的吸光值; A_t为反应40 min后的吸光值. IP(%)是胡敏素样品浓度的函数, 从中可以确定IC_{50}(还原50% DPPH所需的胡敏素样品的浓度), 即IC_{50}值越大, 胡敏素的还原能力越小.

BPA的去除: 以BPA为目标污染物, 研究胡敏素对

其去除作用. 称取0.1 g胡敏素置于10 mL离心管中, 随后加入5 mL 10 mg/L的BPA溶液, 遮光后置于摇床上于220 r/min下震荡反应, 于0、1、2、3、4、5、7 d测定溶液中BPA的浓度. 为了保证取样均匀, 每个取样点均取自单独的离心管, 每个处理设置3个重复. BPA浓度通过高效液相色谱仪(Thermo Fisher Scientific U3000, 美国)测定, 色谱柱为C-18柱. 色谱条件为: 柱温30°C、流动相为甲醇和水(甲醇/水=70/30)、流速0.8 mL/min、进样量100 μL、紫外检测波长225 nm.

2 结果与讨论

2.1 不同类型土壤胡敏素的光谱学表征

不同类型土壤提取胡敏素具有相似的IR特征, 但在强度上存在明显差异. 如图1所示, 10类土壤分离的胡敏素吸收峰主要出现在: 3536~3745 cm^{-1}(醇类、酚类、羧酸类的−O−H或酰胺N−H)、1550~1774 cm^{-1}(芳香环C=C或羧酸类COO−或者类蛋白质)、836~1303 cm^{-1}(醇类或多糖类C−O及腐殖质提取过程中Si−O杂质碳水化合物上的C−O)、694~830 cm^{-1}(芳环上的C−H)[24]. 对胡敏素红外光谱各吸收峰面积进行积分, 根据每个吸收峰面积占所有峰面积和的百分含量来估测其对应官能团组成的含量[25]. 由表2可知, 10类土壤胡敏素在1003 cm^{-1}处均有较宽的吸收带, 吸收峰面积在89.21%以上, 说明具有较强的脂肪族特征. 褐土和黑土在1635 cm^{-1}处的芳香环C=C伸缩振动明显强于其他几种类型, 说明这两种土壤胡敏素中芳香族组分含量相对较高, 这种特殊的结构有利于PFRs的稳定[26].

E_4/E_6与胡敏素的芳香度和芳香碳链的缩合程度有关, 可以作为腐殖化程度指标[27]. E_4/E_6值越大, 芳香族组分的缩合度越小, 分子结构越简单, 分子量越小[28]. 从胡敏素的E_4/E_6比值来看, 潮土提取胡敏素高于其他几种类型土壤来源的胡敏素, 说明潮土中胡敏素的腐殖化程度相对较低, 胡敏素分子结构简单[29]. $SUVA_{254}$主要是由HS大分子中的芳香基团、双键C基团等富电子位点引起, 所以$SUVA_{254}$参数常被用来表征HS的芳香性[30]. 10类土壤中分离的胡敏素的$SUVA_{254}$值范围在0.49~0.79, 黑土的$SUVA_{254}$最高, 表明从黑土分离的胡敏素腐殖化程度高. 多环芳香族基团和芳香族结构含量较高, 表明存在较多的凝聚芳香族环, 这与红外光谱结果相一致.

2.2 不同类型土壤胡敏素的持久性自由基特征

为了研究不同类型土壤中胡敏素PFRs的特征, 对分离所得胡敏素样品进行EPR分析. 如图2(a)所示, 10类土壤胡敏素的EPR谱图都呈现出单一且对称的线型, 未出现超精细分裂结构, 且g因子范围为2.0027~2.0030 (图2(b)), 是土壤、沉积物和水体中天然有机质PFRs的典型特征[31].

电子顺磁共振信号的g因子在本质上反映了分子内部磁场的特性, 是提供分子结构及其环境信息的重

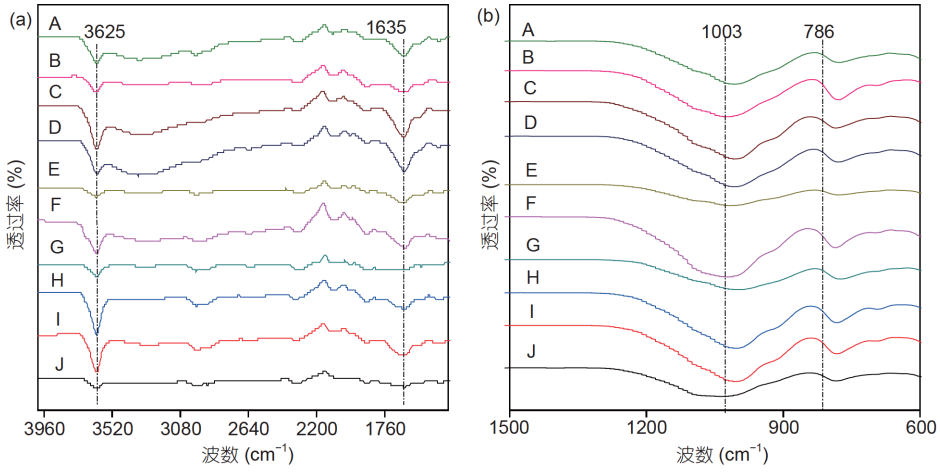

图 1 (网络版彩色)不同类型土壤胡敏素的红外光谱. (a) 1360~4000 cm^{-1}; (b) 600~1500 cm^{-1}. A, 红壤; B, 棕壤; C, 褐土; D, 黑土; E, 栗钙土; F, 漠土; G, 潮土; H, 灌淤土; I, 盐碱土; J, 岩性土

Figure 1 (Color online) The infrared spectra of humin from different soils. (a) 1360–4000 cm^{-1}; (b) 600–1500 cm^{-1}. A, Red soil; B, brown soil; C, cinnamon soil; D, black soil; E, chestnut soil; F, desert soil; G, alluvial soil; H, irrigation-silted soil; I, saline soil; J, lithological soil

表 2 FTIR主要吸收峰的相对强度(半定量)及UV-Vis参数

Table 2 The relative intensity (semi-quantitative) of the main absorption peaks of FTIR and UV-Vis parameters

土壤类型	红外波数(cm^{-1})				紫外参数	
	3536~3745	1550~1774	836~1303	694~830	$SUVA_{254}$	E_4/E_6
红壤	0.68	0.72	91.81	6.79	0.64	4.18
棕壤	0.33	0.37	89.36	9.75	0.53	4.08
褐土	0.33	0.88	92.76	5.43	0.77	3.38
黑土	0.46	0.86	89.21	9.47	0.79	4.25
栗钙土	0.50	0.44	90.15	8.91	0.55	4.58
漠土	0.50	0.74	89.86	8.91	0.53	4.10
潮土	0.59	0.39	91.71	7.26	0.49	4.97
灌淤土	1.17	0.43	90.23	8.21	0.61	3.80
盐碱土	0.91	0.56	90.85	7.67	0.53	3.55
岩性土	0.40	0.35	92.42	6.83	0.55	4.28

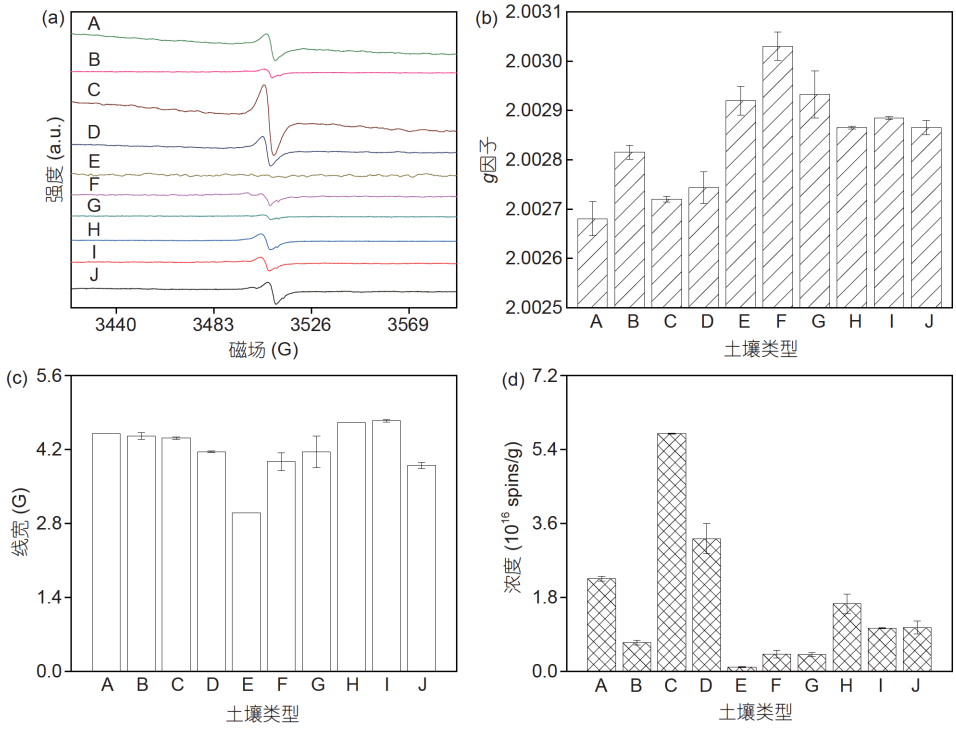

图 2 (网络版彩色)不同类型土壤胡敏素PFRs的EPR谱图(a)、*g*因子(b)、线宽(c)与浓度(d). A, 红壤; B, 棕壤; C, 褐土; D, 黑土; E, 栗钙土; F, 漠土; G, 潮土; H, 灌淤土; I, 盐碱土; J, 岩性土

Figure 2 (Color online) EPR spectra (a), *g* factor (b), line width (c) and concentration (d) of PFRs in humin from different soils. A, Red soil; B, brown soil; C, cinnamon soil; D, black soil; E, chestnut soil; F, desert soil; G, alluvial soil; H, irrigation-silted soil; I, saline soil; J, lithological soil

要参数, 可反映出自由基的类型[32]. 一般来说, 对于环境中的有机质, 依据*g*因子可将自由基分为3类: *g*因子值<2.003, 是以碳原子为中心的自由基; *g*因子值>2.004, 是以氧原子为中心的自由基; *g*因子值介于2.003~2.004之间, 是碳原子为中心的自由基和以氧原子为中心的自由基混合存在, 或是孤电子附近有含氧官能团的碳中心自由基[33]. 根据*g*值判断, 不同类型土壤提取的胡敏素PFRs均属于以碳原子为中心的“芳香

族”自由基[34]. 此外, 线宽反映电子从自旋的激发高能级回到低能级的时间, 即弛豫时间[35].

由图2(c)可知, 不同类型土壤胡敏素EPR谱图的线宽范围为3~4.7 G, 以栗钙土提取的胡敏素线宽最窄, 这与其携带的PFRs浓度较低有关, PFRs之间的距离较远, 使电子“自旋-自旋”相互作用较弱, 造成谱线变窄[36]. 值得注意的是, 不同类型土壤胡敏素PFRs的丰度存在较大差异, 平均值达到1.67×10^{16} spins/g, 这与报道的不同土壤来源的胡敏酸和富里酸中的PFRs浓度处于同一范围[11]. 其中, 以山西的褐土提取的胡敏素所携带的PFRs浓度最大, 达到5.79×10^{16} spins/g, 以内蒙古的栗钙土提取的胡敏素携带的PFRs浓度最小, 仅有0.11×10^{16} spins/g. 这是因为褐土比其他土壤含有更多的芳香族碳和电子共轭体系, 有利于PFRs的稳定存在[16], 这也印证了红外光谱和紫外可见吸收光谱的结果.

由图3可知, PFRs浓度与酚羟基含量呈负相关关系(P<0.05). 这是因为苯环上酚羟基作为取代基时供电子能力较强, 不利于PFRs的稳定存在, 这与前人研究一致[37]. 与羧基含量呈正相关关系(P<0.05), 这与羧基的吸电子诱导效应有关[38]. 此外, 基团对PFRs的影响还与其取代位置有关, 蒽醌类化合物中羧基在C-2处取代时, 会增加C-3、C-4、C-5和C-7处的PFRs浓度[39]. 由图3(c)可知, PFRs浓度与腐殖化指数SUV_{254}呈正相关关系(P<0.05), 腐殖化程度越强, PFRs浓度越高, 即腐殖化过程有利于PFRs的形成和累积. 图3(d)为红外波数1550~1774 cm^{-1}处的面积(即芳香族含量)与PFRs的回归分析, PFRs的浓度与芳香族含量呈正相关关系(P<0.05). 有研究表明, 在芳香碳含量较高的HS中, 电子共轭体系更为完善, 芳香环结构可以使游离电子发生离域, 故PFRs的浓度较高[16,40]. Bayer等人[41]认为, 半醌基团参与腐殖化过程, PFRs信号强度随着腐殖化程度的推进而增加. 有文献[42,43]报道, 随着腐殖化程度的进行, 羧基和芳香族含量逐渐增加, 这与本研究结果一致.

2.3 活性氧的类型及浓度

利用自旋捕获法测定了胡敏素诱导产生ROS的能力. 图4(a)给出了DMPO作为捕获剂时不同类型土壤胡敏素的EPR谱图, 并使用DMPO-OH(a^N=14.3 G, a_β^H=12.7 G, a_γ^H=0.61 G)和DMPO-OOH(a^N=14.3 G, a^H=8.1 G)标准图谱对其进行拟合. 拟合结果发现, 仅在红壤、褐土、黑土、栗钙土4种土壤分离的胡敏素

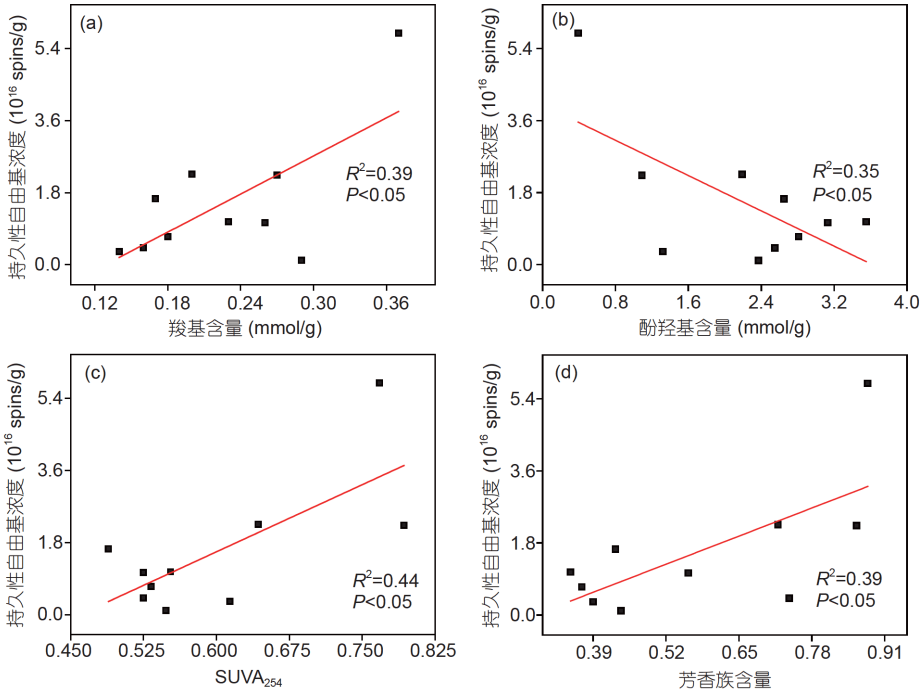

图 3 (网络版彩色)胡敏素PFRs与酚羟基(a)、羧基(b)、$SUVA_{254}$(c)、芳香族含量(d)的回归分析. (d)图的芳香族含量为红外波数1550~1774 cm^{-1}处的面积

Figure 3 (Color online) Regression analyses of PFRs with phenolic hydroxyl (a), carboxyl (b) and $SUVA_{254}$ (c) aromatic group (d) of humin. The content of aromatic group in (d) meant the area at the 1550–1774 cm^{-1} region of infrared spectra

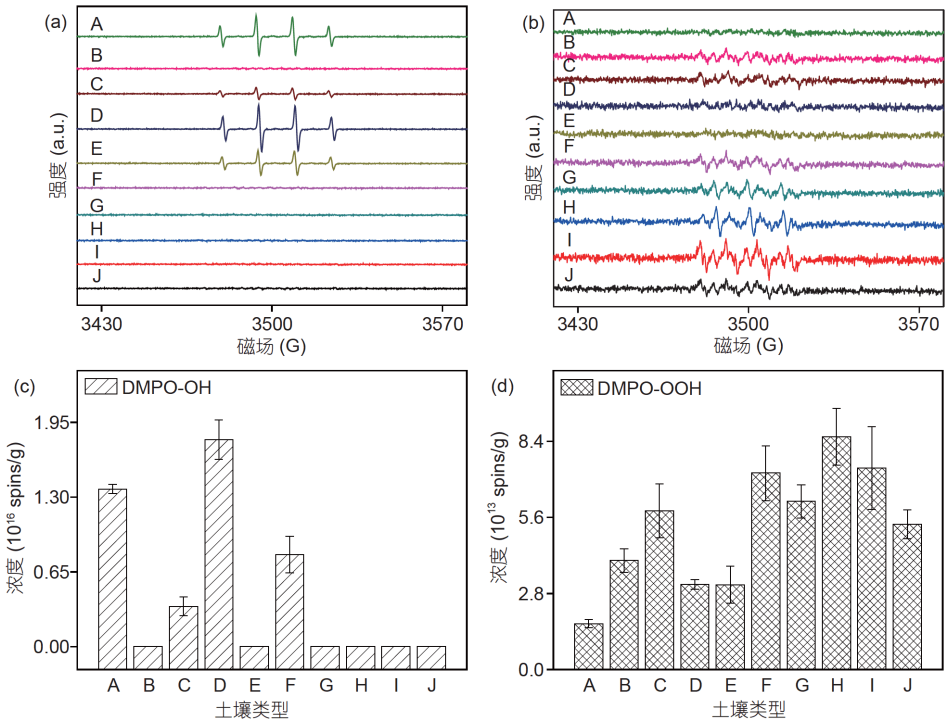

图 4 (网络版彩色)不同类型土壤胡敏素活性氧自由基EPR谱图(a), (b)和浓度(c), (d). A, 红壤; B, 棕壤; C, 褐土; D, 黑土; E, 栗钙土; F, 漠土; G, 潮土; H, 灌淤土; I, 盐碱土; J, 岩性土

Figure 4 (Color online) EPR spectra (a), (b) and concentration (c), (d) of ROS in humin from different soils. A, Red soil; B, brown soil; C, cinnamon soil; D, black soil; E, chestnut soil; F, desert soil; G, alluvial soil; H, irrigation-silted soil; I, saline soil; J, lithological soil

中出现了1:2:2:1的4重峰信号, 也就是DMPO-OH的特征峰, 表明羟基自由基的产生[44]. 当用DMPO的DMSO溶液进行捕获时, 发现10种类型土壤均检测到DMPO-OOH的特征峰信号, 表明超氧自由基的广泛存在[44]. 假设ROS浓度与DMPO-ROS自旋加合物的浓度相当, 以此来量化ROS的浓度. 在黑土和红壤分离的胡敏素中检测到的羟基自由基浓度分别为1.80×10^{16}和1.37×10^{16} spins/g, 栗钙土和褐土分离的胡敏素中检测到的羟基自由基浓度分别为0.80×10^{16}和0.35×10^{16} spins/g. 不同类型土壤分离的胡敏素中检测到的超氧自由基浓度平均为5.25×10^{13} spins/g. 其中, 在灌淤土和盐碱土分离的胡敏素中检测到的超氧自由基浓度最大, 分别为8.57×10^{13}和7.42×10^{13} spins/g, 在红壤中检测到的超氧自由基浓度最小, 仅为1.69×10^{13} spins/g. 不同类型土壤分离的胡敏素中检测到的羟基自由基和超氧自由基浓度不同, 说明不同类型土壤所携带的PFRs的反应活性不同, 导致其对金属离子、有机污染物的迁移转化的影响不同[13,45].

ROS的产生可归因于胡敏素中自由基与氧气的反应. 胡敏素样品暴露在空气中, 导致碳中心自由基和氧气之间的相互作用, 产生一些自由基中间体[46]. 吸附的氧可以结合到有机过氧化物、醇类、醌类、烷氧基和半醌基团中[47]. 当胡敏素样品悬浮在水溶液时, 电子从具有反应活性的碳中心自由基或半醌自由基或氢醌基团位点直接转移到氧上, 生成超氧自由基[48]. 超氧自由基接受来自PFRs的电子生成H_2O_2, H_2O_2进一步与PFRs反应或者通过单电子转移生成羟基自由基[49]. 本研究中胡敏素中的PFRs和超氧自由基浓度之间没有明显的相关性, 说明不同来源胡敏素携带PFRs的反应活性不同. 因为一些结构内的PFRs可能无法与氧气接触, 发生反应. 仅在红壤、褐土、黑土、栗钙土4种土壤分离的胡敏素中检测到羟基自由基, 这可能与PFRs形成过程及土壤本身性质及有关. HS中的PFRs可能是生物残体通过化学和生物等腐殖化过程产生. 在这些过程中, 水解和脱氢反应诱导产生带有未配对电子的酚羟基、半醌、苯胺等单元(基团), 所形成的自由基可能被HS复杂的聚合物网络屏蔽, 亦或通过芳香族π电子系统上的自旋陷阱离域使自由电子不易复合或发生反应, 从而因为空间位阻在共轭苯环结构中得以稳定, 便形成腐殖质类PFRs[14,27]. 然而, 不同来源土壤腐殖化程度不

同，进而导致不同类型土壤胡敏素氧化还原电位[50]、分子结构不同[51,52]，促使其活性氧产生能力不同.

2.4 不同类型土壤胡敏素的氧化还原能力

胡敏素作为HS的重要组成部分，是土壤中最重要的电子载体，其氧化还原能力在环境生物地球化学过程中具有多方面的意义[53,54]. 如图5(a)所示，10种土壤胡敏素对DTT的氧化能力范围在24~376 nmol/(min g). 胡敏素在土壤中的还原能力不可忽视，基于清除DPPH的分光光度法作为分析还原能力的方法，测定了10种土壤提取的胡敏素还原能力. 如图5(a)所示，IC_{50}值表示还原50% DPPH所需的胡敏素的浓度，因此，IC_{50}值越低，胡敏素的还原能力越强. 10种土壤胡敏素对DPPH均表现出一定程度的还原能力，IC_{50}的范围为0.19~1.83 g/mL. 这些结果表明，在一定条件下胡敏素在与DTT作用过程中表现出促氧化性(氧化能力)，与DPPH作用时表现出抗氧化性(还原能力).

相关分析(表3)表明，氧化能力与ROS浓度呈正相关关系(P<0.01)，说明胡敏素的氧化能力主要取决于其产生ROS能力的高低，ROS浓度越高，氧化能力越强. 胡敏素的氧化能力可以用ROS的生成潜力表征，这与大气颗粒物的氧化能力及ROS的生成潜力的测定结果一致[55]. HS中的半醌类自由基被认为是其发生电子转移的主要原因，醌基被认为是腐殖质中PFRs的电子受体[56]，有报道称胡敏酸的氧化能力与PFRs浓度呈正相关关系[57]. 而我们的研究发现，氧化能力与PFRs的相关性未达到显著水平，说明醌基不是唯一的电子受体，这与Struyk和Sposito[58]的研究结果一致. 胡敏素还原能力的强弱取决于结构中的供氢能力或者供电子能力大小，IC_{50}与酚羟基含量呈负相关关系(P<0.05)，即酚羟基含量越高，还原能力越强. 这与前人关于木质素还原能力的研究结果一致[59]. Chen等人[60]研究发现，富含酚羟基和甲氧基的有机质比富含碳水化物的有机质具有更高的反应活性和还原能力，同样证实了酚羟基是有

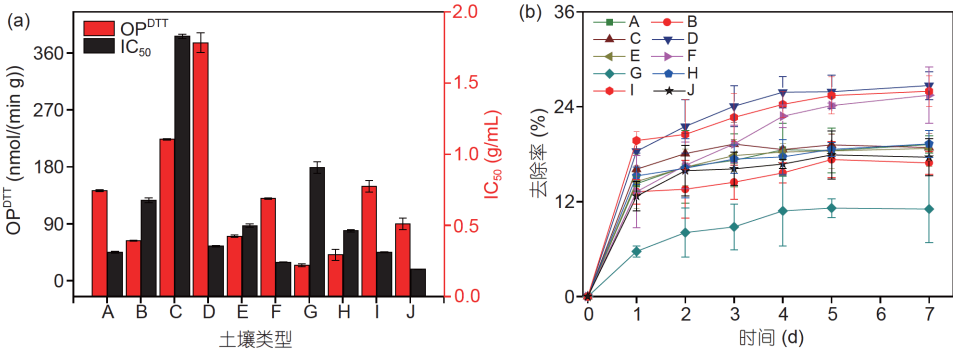

图 5 不同类型土壤胡敏素的氧化还原能力(a)和对BPA的去除率(b). A, 红壤; B, 棕壤; C, 褐土; D, 黑土; E, 栗钙土; F, 漠土; G, 潮土; H, 灌淤土; I, 盐碱土; J, 岩性土

Figure 5 The redox capacity (a) and removal efficiency of BPA (b) of humin from different soils. A, Red soil; B, brown soil; C, cinnamon soil; D, black soil; E, chestnut soil; F, desert soil; G, alluvial soil; H, irrigation-silted soil; I, saline soil; J, lithological soil

表 3 氧化还原能力与酸性基团及PFRs相关分析[a)]

Table 3 Correlation analysis of redox ability with acid groups and PFRs in humin

	−OH	−COOH	PFRs	ROS	OP^{DTT}	IC_{50}	BPA去除率
−OH	1.00						
−COOH	–0.42	1.00					
PFRs	–0.65*	0.68*	1.00				
ROS	–0.40	0.09	0.27	1.00			
OP^{DTT}	–0.52	0.56	0.54	0.78**	1.00		
IC_{50}	–0.74*	0.50	0.72*	–0.21	0.09	1.00	
BPA去除率	0.10	0.28	0.09	0.52	0.67*	–0.39	1.00

a) *表示在0.05水平(双侧)上显著相关; **表示在0.01水平(双侧)上显著相关

机质中还原能力的贡献基团.

为探明胡敏素携带自由基对污染物转化性能的影响, 选择BPA为目标污染物, 研究了其在10种土壤胡敏素中的转化. 如图5(b)所示, 结果显示随着反应时间的延长, 胡敏素对BPA的去除率呈现先增大后逐渐趋于稳定的趋势. 在反应7 d后, 10种土壤胡敏素BPA的去除率为11.06%~26.69%. 由表3可知, 胡敏素对BPA的去除率与其氧化能力呈正相关关系(P<0.05), 而胡敏素氧化能力与ROS具有较大的相关性, 即胡敏素氧化能力越强, ROS生成量越大, 对BPA的去除率越高[61].

3 结论

(1) 10种土壤胡敏素中均检测到PFRs, 属于以碳原子为中心的"芳香族"自由基. PFRs浓度范围为0.11~5.79×10^{16} spins/g. 从元素分析、基团含量及光谱分析结果来看, 与酚羟基相比, 芳香结构及羧基更有利于PFRs的累积; 腐殖化程度越强, PFRs浓度越高. (2) 土壤胡敏素中均可检测到超氧自由基, 浓度范围为1.69~8.57×10^{13} spins/g, 但仅在部分样品(红壤、黑土、栗钙土和褐土提取的胡敏素)中检测到羟基自由基. ROS与PFRs的浓度未达到显著相关, 表明不同土壤类型胡敏素PFRs的活性不同. (3) 土壤胡敏素对DTT的氧化能力在24~376 nmol/(min g)之间, 还原能力IC_{50}的范围为0.19~1.83 g/mL. 氧化能力与ROS浓度呈正相关关系(P<0.01), 表明胡敏素的氧化能力与ROS浓度的高低有关, ROS浓度越高, 氧化还原能力越强. IC_{50}与酚羟基含量呈负相关关系(P<0.05), 表明酚羟基是负责还原能力的主要基团. 土壤胡敏素对BPA的去除率与氧化能力呈正相关关系(P<0.05), 证实了ROS对BPA去除率的贡献.

参考文献

1 Zhang J J, Dou S, Li C L, et al. Studies on fractionation of soil humus (in Chinese). Chin J Soil Sci, 2004, 35: 706−709 [张晋京, 窦森, 李翠兰, 等. 土壤腐殖质分组研究. 土壤通报, 2004, 35: 706−709]

2 Van der Zee F P, Cervantes F J. Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review. Biotechnol Adv, 2009, 27: 256–277

3 van der Zee F P, Bouwman R H M, Strik D P B T B, et al. Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors. Biotechnol Bioeng, 2001, 75: 691–701

4 Wen B, Zhang J J, Zhang S Z, et al. Phenanthrene sorption to soil humic acid and different humin fractions. Environ Sci Technol, 2007, 41: 3165–3171

5 Borisover M, Graber E R. Hydration of natural organic matter: Effect on sorption of organic compounds by humin and humic acid fractions vs original peat material. Environ Sci Technol, 2004, 38: 4120–4129

6 Fan C Y, Xie X H, Yan A C, et al. Structure and Cu (II) adsorption of soil humin (in Chinese). Acta Pedol Sin, 2018, 55: 1460−1471 [范春莹, 谢修鸿, 燕爱春, 等. 土壤胡敏素结构特征及对铜离子的吸附特性. 土壤学报, 2018, 55: 1460−1471]

7 Luan F B, Xie L, Li J, et al. Redox behavior and research progress of humic acid (in Chinese). Chemistry, 2008, 11: 833–837 [栾富波, 谢丽, 李俊, 等. 腐殖酸的氧化还原行为及其研究进展. 化学通报, 2008, 11: 833–837]

8 Rex R W. Electron paramagnetic resonance studies of stable free radicals in lignins and humic acids. Nature, 1960, 188: 1185–1186

9 Lomnicki S, Gullett B, Stöger T, et al. Combustion by-products and their health effects—Combustion engineering and global health in the 21st century. Int J Toxicol, 2014, 33: 3–13

10 Jia H, Shi Y, Nie X, et al. Persistent free radicals in humin under redox conditions and their impact in transforming polycyclic aromatic hydrocarbons. Front Environ Sci Eng, 2020, 14: 73

11 Ćwieląg-Piasecka I, Witwicki M, Jerzykiewicz M, et al. Can carbamates undergo radical oxidation in the soil environment? A case study on carbaryl and carbofuran. Environ Sci Technol, 2017, 51: 14124–14134

12 Yang Z, Du M, Jiang J. Reducing capacities and redox potentials of humic substances extracted from sewage sludge. Chemosphere, 2016, 144: 902–908

13 Xu J, Dai Y, Shi Y, et al. Mechanism of Cr(VI) reduction by humin: Role of environmentally persistent free radicals and reactive oxygen species. Sci Total Environ, 2020, 725: 138413

14 Saab S C, Martin-Neto L. Studies of semiquinone free radicals by ESR in the whole soil, HA, FA and humin substances. J Braz Chem Soc, 2004, 15: 34–37

15 Shi Y, Dai Y, Liu Z, et al. Light-induced variation in environmentally persistent free radicals and the generation of reactive radical species in humic substances. Front Environ Sci Eng, 2020, 14: 106

16 Watanabe A, McPhail D B, Maie N, et al. Electron spin resonance characteristics of humic acids from a wide range of soil types. Org Geochem,

2005, 36: 981–990
17 Qiu W, Chen J, Li Y, et al. Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Ecotox Environ Safe, 2016, 130: 93–102
18 Peng X, Wang Z, Mai B, et al. Temporal trends of nonylphenol and bisphenol A contamination in the Pearl River Estuary and the adjacent South China Sea recorded by dated sedimentary cores. Sci Total Environ, 2007, 384: 393–400
19 Lao J C. Soil Agrochemical Analysis (in Chinese). Beijing: Agricultural Press, 1988. 234–236 [劳家柽. 土壤农化分析手册. 北京: 农业出版社, 1988. 234–236]
20 Paul A, Stösser R, Zehl A, et al. Nature and abundance of organic radicals in natural organic matter: Effect of pH and irradiation. Environ Sci Technol, 2006, 40: 5897–5903
21 Schnitzer M, Gupta U C. Determination of acidity in soil organic matter. Soil Sci Soc Am J, 1965, 29: 274–277
22 Cho A K, Sioutas C, Miguel A H, et al. Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. Environ Res, 2005, 99: 40–47
23 Dizhbite T, Telysheva G, Jurkjane V, et al. Characterization of the radical scavenging activity of lignins—Natural antioxidants. Bioresour Technol, 2004, 95: 309–317
24 Baes A U, Bloom P R. Diffuse reflectance and transmission fourier transform infrared (drift) spectroscopy of humic and fulvic acids. Soil Sci Soc Am J, 1989, 53: 695–700
25 Sun W L, Ni J R, Liu T T. Effect of sediment humic substances on sorption of selected endocrine disruptors. In: Kronvang B, Faganeli J, Ogrinc N, eds. The Interactions between Sediments and Water. Dordrecht: Springer, 2006
26 Vejerano E P, Rao G, Khachatryan L, et al. Environmentally persistent free radicals: Insights on a new class of pollutants. Environ Sci Technol, 2018, 52: 2468–2481
27 Kononova A M M. Soil Organic Matter. Oxford: Pergamon Press, 1996. 40–41
28 Stevenson F J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. New York: John Wiley & Sons, 1994
29 Senesi N, D'Orazio V, Ricca G. Humic acids in the first generation of Eurosoils. Geoderma, 2003, 116: 325–344
30 Kim H C, Yu M J, Han I. Multi-method study of the characteristic chemical nature of aquatic humic substances isolated from the Han River, Korea. Appl Geochem, 2006, 21: 1226–1239
31 Oniki T, Takahama U. Effects of reaction time, chemical reduction, and oxidation on ESR in aqueous solutions of humic acids. Soil Sci, 1994, 158: 204–210
32 Khachatryan L, Adounkpe J, Maskos Z, et al. Formation of cyclopentadienyl radical from the gas-phase pyrolysis of hydroquinone, catechol, and phenol. Environ Sci Technol, 2006, 40: 5071−5076
33 Fang G, Gao J, Liu C, et al. Key role of persistent free radicals in hydrogen peroxide activation by Biochar: Implications to organic contaminant degradation. Environ Sci Technol, 2014, 48: 1902–1910
34 Jia H, Nulaji G, Gao H, et al. Formation and stabilization of environmentally persistent free radicals induced by the interaction of anthracene with Fe(III)-modified clays. Environ Sci Technol, 2016, 50: 6310–6319
35 Dellinger B, Lomnicki S, Khachatryan L, et al. Formation and stabilization of persistent free radicals. Proc Combust Inst, 2007, 31: 521–528
36 Guo D Y, Han D X. Electron paramagnetic resonance studies of the structurally disturbed coals (in Chinese). J China Univ Min Technol, 1999, 28: 94–97 [郭德勇, 韩德馨. 构造煤的电子顺磁共振实验研究. 中国矿业大学学报, 1999, 28: 94–97]
37 Mathew S, Abraham T E, Zakaria Z A. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under *in vitro* conditions. J Food Sci Technol, 2018, 52: 5790–5798
38 Tang J, Qu S, Hu J, et al. A new organic dye bearing aldehyde electron-withdrawing group for dye-sensitized solar cell. Sol Energy, 2012, 86: 2306–2311
39 Stockfisch D, Kaaber M, Pedersen J A. Calculation of hyperfine splitting constants in anthrasemiquinones with electron-donating and -withdrawing substituents by additivity relations. Magn Reson Chem, 1996, 34: 619–624
40 Senesi N. Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. Adv Soil Sci, 1990, 14: 77–130
41 Bayer C, Martin-Neto L, Mielniczuk J, et al. Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies. Geoderma, 2002, 105: 81–92
42 Bonde T A, Christensen B T, Cerri C C. Dynamics of soil organic matter as reflected by natural ^{13}C abundance in particle size fractions of forested and cultivated oxisols. Soil Biol Biochem, 1992, 24: 275–277
43 Zech W, Senesi N, Guggenberger G, et al. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. Geoderma, 1997, 79: 117–161
44 Zhao S, Gao P, Miao D, et al. Formation and evolution of solvent-extracted and nonextractable environmentally persistent free radicals in fly ash of municipal solid waste incinerators. Environ Sci Technol, 2019, 53: 10120–10130

45 Jiang J, Kappler A. Kinetics of microbial and chemical reduction of humic substances: Implications for electron shuttling. Environ Sci Technol, 2008, 42: 3563–3569

46 Radovic L R. Active sites in graphene and the mechanism of CO_2 formation in carbon oxidation. J Am Chem Soc, 2009, 131: 17166–17175

47 Zhu K, Jia H, Zhao S, et al. Formation of environmentally persistent free radicals on microplastics under light irradiation. Environ Sci Technol, 2019, 53: 8177–8186

48 Zhu K, Jia H, Wang F, et al. Efficient removal of Pb(II) from aqueous solution by modified montmorillonite/carbon composite: Equilibrium, kinetics, and thermodynamics. J Chem Eng Data, 2017, 62: 333–340

49 Fang G, Zhu C, Dionysiou D D, et al. Mechanism of hydroxyl radical generation from biochar suspensions: Implications to diethyl phthalate degradation. Bioresour Technol, 2015, 176: 210–217

50 Petigara B R, Blough N V, Mignerey A C. Mechanisms of hydrogen peroxide decomposition in soils. Environ Sci Technol, 2002, 36: 639–645

51 McDonald S, Bishop A G, Prenzler P D, et al. Analytical chemistry of freshwater humic substances. Anal Chim Acta, 2004, 527: 105–124

52 Sun L, Qian J, Blough N V, et al. Insights into the photoproduction sites of hydroxyl radicals by dissolved organic matter in natural waters. Environ Sci Technol Lett, 2015, 2: 352–356

53 Tratnyek P G, Grundl T J, Haderlein S B. Aquatic Redox Chemistry. Washington DC: American Chemical Society, 2011. 113–127

54 Piepenbrock A, Schröder C, Kappler A. Electron transfer from humic substances to biogenic and abiogenic Fe(III) oxyhydroxide minerals. Environ Sci Technol, 2014, 48: 1656–1664

55 Charrier J G, Anastasio C. On dithiothreitol (DTT) as a measure of oxidative potential for ambient particles: Evidence for the importance of soluble transition metals. Atmos Chem Phys, 2012, 12: 9321–9333

56 Scott D T, McKnight D M, Blunt-Harris E L, et al. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. Environ Sci Technol, 1998, 32: 2984–2989

57 Steelink C, Tollin G. Stable free radicals in soil humic acid. Biochim Biophys Acta, 1962, 59: 25–34

58 Struyk Z, Sposito G. Redox properties of standard humic acids. Geoderma, 2001, 102: 329–346

59 Li Z, Zhang J, Qin L, et al. Enhancing antioxidant performance of lignin by enzymatic treatment with laccase. ACS Sustain Chem Eng, 2018, 6: 2591–2595

60 Chen J, Yang J, Ma L, et al. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. Sci Rep, 2020, 10: 2611

61 Talukdar K, Jun B M, Yoon Y, et al. Novel Z-scheme Ag_3PO_4/Fe_3O_4-activated biochar photocatalyst with enhanced visible-light catalytic performance toward degradation of bisphenol A. J Hazard Mater, 2020, 398: 123025

Summary for “土壤胡敏素的自由基特性、氧化还原性及其影响因素”

Free radical property, redox capacity, and the relevant influencing factors of soil humin

Yafang Shi[1], Ziwen Liu[1], Yunchao Dai[1], Hanzhong Jia[1,2*] & Lingyan Zhu[1,2]

[1] *College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;*
[2] *State Key Laboratory of Soil Erosion & Dryland Farming on the Loess Plateau, Institute of Soil & Water Conservation, Northwest A&F University, Yangling 712100, China*
* Corresponding author, E-mail: jiahz@nwafu.edu.cn

Humic substances (HS) contain considerable quantities of persistent free radicals (PFRs), which have been detected by the electron paramagnetic resonance (EPR) technique. Among three HS fractions (humin, fulvic acid, and humic acid), humin is recognized as the predominant fraction possessing PFRs. Most of the previous studies of HS-PFRs involved their environmental effect; however, very few investigations have been conducted to explore the relationship among structural characteristics, PFRs, and redox capacity of humin. To address the above-mentioned scientific questions, the types and concentrations of PFRs in 10 representative types of soils were investigated by EPR technique. We found that humin from different soils contained PFRs concentration of 0.11×10^{16}–5.79×10^{16} spins/g and *g*-factors of less than 2.0030. These PFRs were assigned as carbon-centered “aromatic-type” radicals. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, ultraviolet-visible, and the contents of acid groups indicated that the aromatic structure of humin was beneficial for the formation of PFRs. The concentration of PFRs was negatively correlated with phenolic hydroxyl contents (P<0.05) and positively correlated with carboxyl contents (P<0.01). The potential generation of reactive oxygen species (ROS) in humin was determined by spin-trapping EPR technique. Superoxide radicals (average concentration of up to 5.25×10^{13} spins/g) were detected in humin from all soils while hydroxyl radicals were detected only in the samples extracted from red soil, black soil, chestnut soil and brown soil. The redox capacity of humin was evaluated by dithiothreitol (DTT) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The oxidation capacity of humin was in the range of 24−376 nmol/ (min g) and the IC_{50} was in the range of 0.19−1.83 g/mL, and the It was shown by correlation analysis that the oxidation capacity of humin was directly related to its ROS concentration, and phenolic hydroxyl contributed to the reduction capacity. The removal of bisphenol A (BPA) by humins derived from 10 representative soils indicated that the removal rate of BPA was positively correlated with the oxidation capacity of humin (P<0.05), and the oxidation ability was positively correlated with ROS concentration (P<0.05), confirming that the contribution of ROS to BPA removal efficiency. These results provided a theoretical basis for evaluating the ecological and environmental effects of humin in various soil systems.

humin, persistent free radicals, reactive oxygen species, redox capacity

doi: 10.1360/TB-2020-0965