

等离子体活化水中 pH 介导调控实现化学活性高效 储存及抗癌效应

庞波伦, 高钰婷, 刘志杰

(西安交通大学等离子体生物医学研究中心, 西安 710049)

摘要: 等离子体活化水(plasma-activated water, PAW)中活性氮氧粒子(reactive oxygen and nitrogen species, RONS)快速衰减限制了其生物医学应用, 因此提出了一种 pH 介导调控的储存策略。该研究发现空气表面放电时间延长至电极温度稳态 140 °C 时, 放电模式发生臭氧主导型向氮氧化物主导型的动态转变, 进而改变了 RONS 的浓度变化趋势; 储存时, 中性环境(pH=7)可有效抑制 H₂O₂ 的分解, 碱性环境(pH=10)通过质子转移抑制 NO₂⁻与 ONOO⁻/O₂⁻ 的衰减速率。储存结束时, 酸化至初始酸性环境能有效恢复 PAW 化学活性, 中性储存 PAW 保持最佳抗癌效力。基于“中性/碱性储存-酸性激活”的 pH 调控策略, PAW 生物活性在常温下长效维持。该研究揭示了放电模式转变和 pH 调控对 PAW 剂量的影响, 为开发具有长效高活性的 PAW 提供了理论依据。

关键词: 空气表面放电; 等离子体活化水; pH 调控; 活性氮氧粒子; 抗癌效应

pH-mediated Regulation of Plasma-activated Water for Efficient Chemical Activity Storage and Anticancer Effect

PANG Bolun, GAO Yuting, LIU Zhijie

(Center for Plasma Biomedicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: The rapid decay of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) in plasma-activated water (PAW) limits its biomedical applications. To address this issue, we propose a pH-mediated storage strategy. Our study reveals that prolonging air surface discharge time until the electrode temperature stabilizes at 140 °C can induce a dynamic transition from ozone-dominated to nitrogen oxide-dominated regimes, thereby altering RONS concentration trends. During storage, a neutral environment (pH=7) effectively suppresses H₂O₂ decomposition, while an alkaline environment (pH=10) slows NO₂⁻ and ONOO⁻/O₂⁻ decay rates through proton transfer. Acidifying the stored PAW to its initial acidic pH successfully restores its chemical activity, with neutral-stored PAW maintaining optimal anticancer efficacy. By implementing a pH regulation strategy based on “neutral/alkaline storage-acidic activation”, the bioactivity of PAW is preserved long-termly at room temperature. This work elucidates the critical roles of discharge mode transition and pH regulation in determining PAW dosage, providing a theoretical foundation for developing PAW with sustained high activity.

Key words: air surface discharge; plasma-activated water; pH-mediated regulation; reactive nitrogen and oxygen species; anticancer effect

0 引言

等离子体活化水(plasma-activated water, PAW)是一种新型多用途绿色溶液^[1], 在等离子体放电过程中, 水分子与高能电子、激发态原子和分子等发生一系列复杂的物理化学反应^[2], 使得水中富集多种活性氧氮粒子(reactive oxygen and nitrogen species, RONS)和其他高活性自由基等^[3]。这些活性粒

子赋予了 PAW 广谱抑菌、促进伤口愈合、消融肿瘤等生物医学效应, 使其在消毒杀菌、医疗护理、癌症治疗等领域展现出巨大的应用潜力^[4]。然而, PAW 中 RONS 的浓度和稳定性是影响其生物功效的最关键因素。研究表明, PAW 虽具有较高的活性粒子浓度^[5], 但在常温常压条件下容易发生自分解, 导致其生物活性随时间衰减直到最终消失^[6]。因此, 如何提高 PAW 中活性粒子的浓度和稳定性, 延长其保质期, 已成为该领域亟待解决的重要科学问题。

针对上述问题, 研究人员从 PAW 的生成和存

储两个方面开展了大量探索。生成方面, 通过优化放电时间、放电功率和工作气体等电气参数, 提高水与等离子体的相互作用效率^[7], 从而获得高浓度的 RONS。例如, Pang 等人发现氩气等离子体射流制备的 PAW 的 RONS 浓度和生物效应, 显著优于氦气^[8]。Shao 等人通过优化脉冲参数, 使用上升沿较快、宽度较窄的百纳秒量级脉冲电源驱动产生等离子体, 产生的活化水中 NO_2^- 浓度最高为 0.12 mmol/L ^[9]。储存方面, 研究人员采用多种化学和物理方法来提高 PAW 的稳定性。Li 等人使用超低浓度乙醇溶液生成活化乙醇溶液, 协同低温冷冻使其保质期可达 3 d^[10]。Wang 等通过将过期的 PAW 重新活化, 恢复了 PAW 的活性^[11]。目前温度被证实是影响 PAW 理化性质和稳定性的重要参数^[12]。Shen 等人研究了不同储存温度的 PAW 对金黄色葡萄球菌的灭菌特性, 发现温度越低, PAW 活性保存得越好, -80°C 条件下 PAW 在 30 天内都有着很好的活性^[13]。Zhou 等人研究了储存温度对 PAW 中 ONOOH 稳定性的影响, 发现 -20°C 条件下储存 24 h 后的 ONOOH 的浓度是 25°C 时的 2 倍^[14]。但上述方法仍存在一些不足: 电气特性无法延长存储时间; 降温冷冻能耗较高; 化学试剂的使用易引入杂质和毒副产物。因此, 亟须一种简单、高效、环保的新方法来提升 PAW 的品质。

pH 值是影响水中化学反应的关键因素, 通过调节水的酸碱度, 可显著改变活性粒子的存在形式、反应途径和动力学特征。以 H_2O_2 为例, 其在酸性条件下(pH 值 <4)稳定性较好, 而碱性环境有利于 H_2O_2 分解为 O_2 和 H_2O ^[15]。Ikawa 等人考察了 pH 值对 PAW 杀菌效果的影响, 发现酸性 PAW 对金黄色葡萄球菌的杀灭效率显著优于中性和碱性 PAW^[16]。Pang 等人也发现, 维持放电过程中 PAW 的碱性环境, 可使其中 H_2O_2 和 NO_2^- 的浓度提高了将近 10 倍^[17]。一般而言, pH 值决定溶液中质子(H^+)和氢氧根(OH^-)的浓度。当 pH 值 <7 时, 溶液呈酸性, H^+ 浓度较高, 化学平衡向生成弱酸(如 HNO_2 、 HO_2)的方向移动, 导致 PAW 中 NO_2^- 、 O_2^- 等粒子大量转化为相应的不稳定的共轭酸。当 pH 值 >7 时, 溶液呈碱性, OH^- 浓度较高, 上述反应正好相反。

上述研究表明, 关于等离子体物理特性引起的 PAW 活性粒子变化机制以及 pH 值对不同 RONS 稳定性的影响规律仍缺乏整体性研究。本研究采用典型的介质阻挡放电(dielectric barrier discharge, DBD)

等离子体活化水装置, 以医用级去离子水为处理对象。探究了空气表面放电的物理特性及其对 PAW 中关键活性粒子(H_2O_2 、 NO_2^- 、 ONOO^-)浓度和抗癌活性的影响规律; 深入探讨了不同 pH 值(4、6、7、8、10)对 PAW 存储稳定性的调控机制; 最后评估了不同 pH 值存储下 PAW 抗癌功效的影响。研究结果将为高质量 PAW 的规模化制备提供理论基础和技术指导, 推动 PAW 在生物医学领域的创新应用。

1 实验装置与方法

1.1 实验装置

实验采用图 1 所示的 PAW 生成装置, 包括高压交流电源、DBD 反应装置和参数检测系统。DBD 反应装置采用电子工程领域广泛应用的印刷电路板技术, 自制了一种高效稳定的沿面放电等离子体发生装置。装置采用典型的“介质阻挡放电”三明治式结构, 使用 1.6 mm 厚的 FR-4 玻璃纤维板为放电所需的介质层。在基板两侧分别镀上厚度为 $43 \mu\text{m}$ 的铜层, 分别作为高压电极和地电极。高压电极设计为直径 60.0 mm 的圆形铜盘, 铜制六边形边界形成地电极, 内部为裸露的基板材料。实验中采用外置风扇控制电极温度, 避免介质层出现热击穿。实验在大气压环境空气下进行, 工作电压为 13.0 kV, 频率为 20.0 kHz, 该参数在先前研究中可较好平衡放电稳定性与活性粒子产率^[17]。等离子体在地电极表面形成, 放电图像如图 1 所示。

1.2 电特性诊断

在光学特性方面, 采用数码相机(型号为 D7000)和 ICCD 相机(型号为 PIMAX3)检测等离子体形态, 采用光学发射光谱仪 OES(型号为 SR-750i)和傅里叶红外光谱 FTIR(型号为 Tensor II)检测气相活性粒子。在电学特性方面, 采用高压探头(型号为 P6015A)测量放电电压, 采用罗戈夫斯基线圈(型号为 2877)测量放电电流, 采用示波器(型号为 MDO3054)记录并保存电压电流波形。

1.3 PAW 生产、储存和粒子浓度分析

采用医用级去离子水作为处理对象, 用量为 5 mL。等离子体发生装置的地电极距液面 12 mm, 活化时间设定为 1~5 min。活化后立即对 PAW 进行理化特性检测, 包括 pH 值、氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP)和电导率(electrical conductivity, EC)。pH 值测定采用 METTLER-TOLEDO FE20 型 pH 计, ORP 测定采用 S210-K 型 ORP 计,

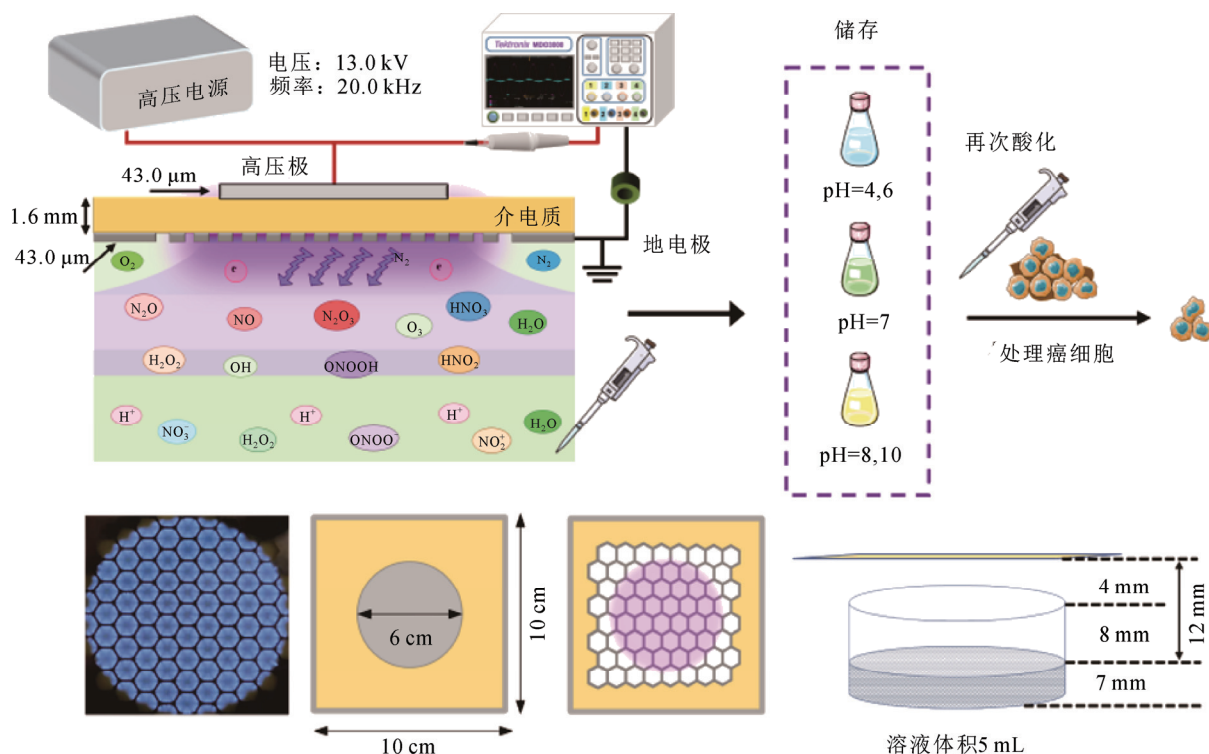


图1 空气表面放电 PAW 生成装置

Fig.1 Schematic of the air surface discharge PAW generation system

EC 测定采用 REX DDS-307A 型电导率仪。所有测量均在活化后 2 min 内完成, 每组实验独立重复 3 次。液相活性粒子分为长寿命粒子和短寿命粒子, 对于长寿命粒子的检测, 采用比色法进行定量分析: 其中 NO_2 浓度使用经典的格里斯试剂(Griess)测定, H_2O_2 浓度使用 Amlpex Red 试剂法进行测定。短寿命粒子采用电子自旋共振谱仪(electron spin resonance, ESR)结合捕捉剂 TEMPONE-H(化学名称: 1-Hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-oxo-piperidine)进行检测, 自旋捕捉剂的最终浓度为 10 mmol/L, Bruker EMXplus 谱仪工作参数设定为: 中心磁场为 0.351 T, 扫描范围为 0.01 T, 微波功率为 2 mW, 扫描次数 5 次以提高信噪比。

存储样品的 pH 调节方法如下, 将 87 mL 的浓度为 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)和 13 mL 的磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)混合定容至 200 mL, 配置成为 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值为 7.6)。缓冲液与 PAW 按照 1:1 比例混合, 少量高纯度的盐酸(HCl)或氢氧化钠(NaOH)溶液来进行 pH 值精细调节, 精密 pH 计监测, 最终获得 pH 值为 4、6、7、8、10 的系列样品。所有样本均保存在避光、密闭条件下以排除干扰。

1.4 癌细胞培养

A549 非小细胞肺癌细胞(non-small cell lung cancer, NSCLC)在添加了 10%胎牛血清、1%体积分数)链霉素和青霉素的 Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1 640 培养基中培养。将 5 000 个细胞接种到 96 孔板的每个孔中(100 μL 培养基), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的湿润气体中培养 24 h 后, 用 60%RPMI1640 培养基(60 μL)+40%PAW(40 μL)换液, 并再培养 24 h。PAW 在使用前酸化至初始酸性环境, 排除 pH 值对于细胞的影响。使用细胞活力检测试剂(型号为 C0065S)评估活化水抗癌特性。使用 t 检验(Student's t test)分析实验差异性, 以两独立组间 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

2 结果与讨论

2.1 放电特性

由图 2 可见, 空气表面放电的典型电压电流波形在 1 个完整放电周期内表现出明显的不对称特征。在负半周期内, 电流波形呈现大量窄脉冲放电特性, 每个脉冲对应 1 次微放电, 呈现典型的丝状放电形态。同时, 负半周期的电流幅值显著高于正

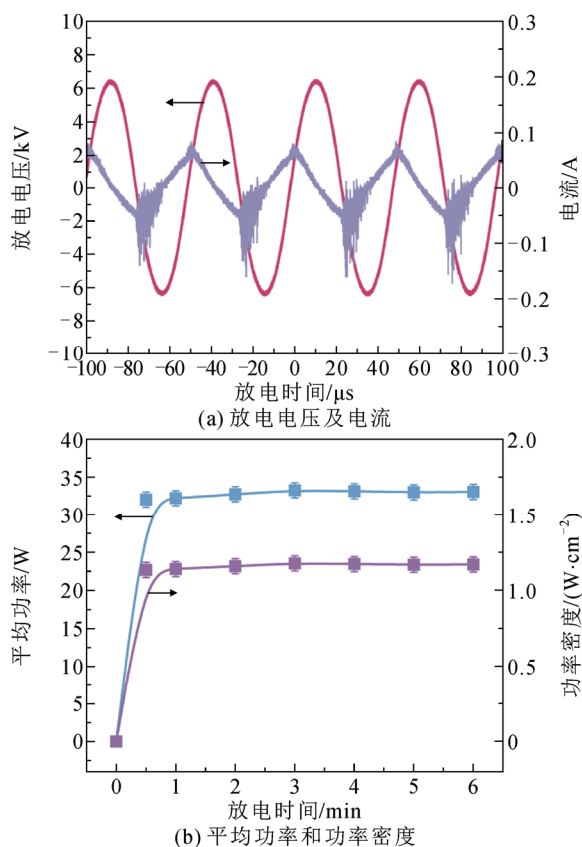


Fig.2 Air surface discharge electrical characteristics

半周期, 这种不对称现象主要源于电荷在介质表面的累积效应。具体而言, 放电过程中的电子和离子沿介质表面积累, 导致局部电场强度增强。当局部电场强度逐渐接近或超过空气的击穿阈值时, 该区域的气体迅速电离, 形成瞬态强放电^[18]。通过对多个放电周期的电压电流波形进行积分分析可知, 在施加 13 kV(峰-峰值)电压时, 对应的放电电流峰-峰值为 200 mA, 由此计算得到平均放电功率为 33 W。值得注意的是, 在整个放电过程中, 放电功率和功率密度始终保持稳定, 这为后续研究提供了恒定的实验条件。

2.2 热成像分析

图 3 展示了空气表面放电过程中介质板表面的温度分布演化。初始放电阶段中, 温度分布呈现明显的中心对称性, 即介质板中心区域温度较高, 向外围逐渐降低, 形成典型的径向温度梯度分布。随着放电持续进行, 该温度梯度逐步向外扩散, 最终遍及整个介质板表面。通过定量分析温度变化趋势可知, 在放电初期(0~2 min), 靠近地电极区域的介质板温度从 26.2 °C 急剧升高至 122.6 °C; 而在放电中后期(3~5 min), 温度上升速率显著降低, 最终稳

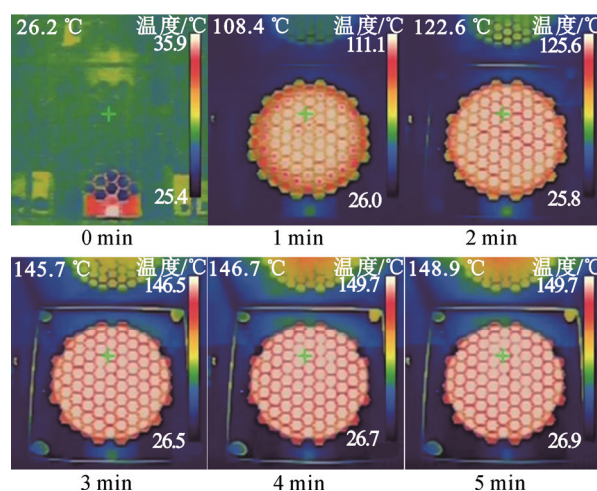


图 3 地电极热成像图随放电时间变化

Fig.3 Thermal images of the ground electrode

定于 148.9 °C。基于上述温度演化特征, 可将整个放电过程划分为两个典型阶段: 0~3 min 的快速升温阶段和 3~5 min 的温度稳定阶段。

2.3 等离子体时空演化分析

图 4 展示了空气表面放电在一个完整周期内的时空演化特征。实验表明, 等离子体主要在靠近接地电极的介质板表面产生, 并在六边形不锈钢网格内呈现均匀分布。放电形态表现为典型的丝状结构, 这些丝状放电在介质表面上呈随机分布特征。进一步分析放电的时序特性可知, 正半周期的放电过程始于 1.73 μs, 放电强度在 5.23 μs 达到最大值, 随后逐渐衰减, 并于 17.23 μs 完全熄灭。相比之下, 负半周期的放电过程起始于 26.73 μs, 在 27.23 μs 首次达到最大强度, 经短暂衰减后于 28.23 μs 出现第二次增强, 最终于 42.23 μs 完全熄灭。值得注意的是, 最强的放电现象集中在六边形边缘区域, 这主要归因于介质板表面空间电荷分布对局部电场的增强效应。

2.4 发射光谱和傅里叶红外光谱特性分析

图 5 显示了空气表面放电的光学发射光谱。光谱主要为 $N_2(C^3\Pi_u-B^3\Pi_g)$ 跃迁系列(315.9~405.8 nm)及其二次衍射(631.7~715.2 nm)主导, 这与空气中氮气作为主要组分(约 78%)的特性相符。由于液面距离放电区较远(12 mm), 水蒸气很难扩散到放电区域形成 OH 带。OH、O 原子和 H 的谱线相对较弱且不明显。并且 $N_2^+(B^2\Sigma_u^+ \rightarrow X^2\Sigma_g^+)$ 跃迁带的发射强度相对微弱。首先, 环境空气下氧气分子对 $N_2^+(B)$ 激发态具有显著的淬灭作用。其次, $N_2^+(B^2\Sigma_u^+ \rightarrow X^2\Sigma_g^+)$ 跃迁所需的激发能量(18.76 eV)超过 $N_2(C^3\Pi_u-B^3\Pi_g)$

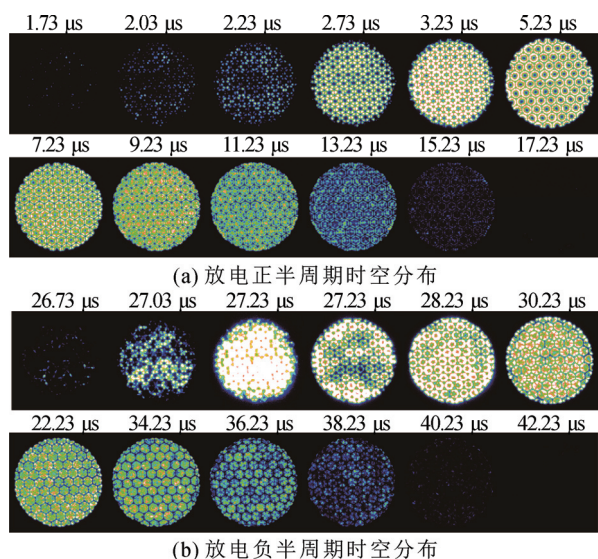


图4 放电正半周期和负半周期的时空分布

Fig.4 Spatial and temporal distributions of discharge

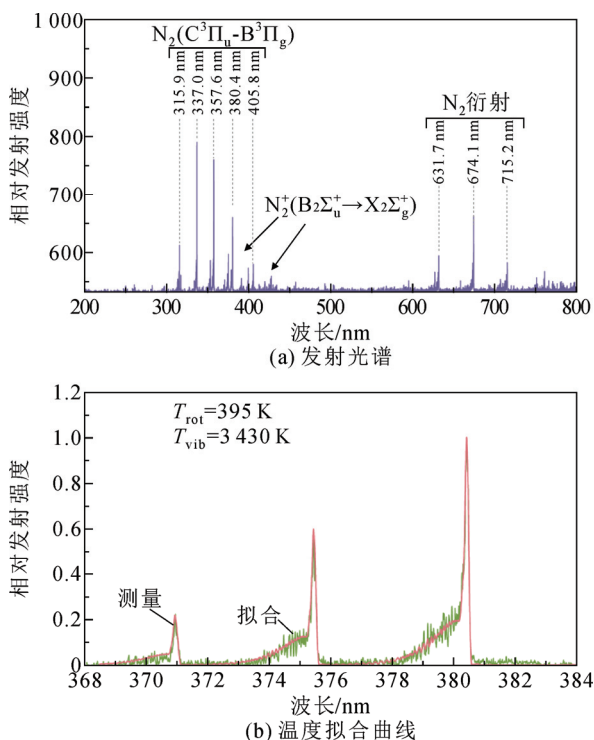


图5 空气表面放电发射光谱及温度拟合曲线

Fig.5 Emission spectra and fitting curves of air surface discharge

激发能量(7.35、11.03 eV)^[19]。最后 $N_2^+(B^2\Sigma_u^+)$ 的产生则主要依赖于电子与基态 N_2 或亚稳态 $N_2(A^3\Sigma_u^+)$ 的高能碰撞,而 $N_2(C^3\Pi_u)$ 更能通过亚稳态 $N_2^+(A^2\Sigma_u^+)$ 的分子之间的能量池化过程^[20]。

进一步选择特定波长范围内的光谱细节以及对应的拟合结果。绿色曲线为实验测量的光谱,红

色曲线为基于光谱模型的拟合曲线。拟合后转动温度(T_{rot})约为 395 K, 振动温度(T_{vib})为 3 430 K。这 2 个温度的明显差异反映了等离子体的非平衡态特性。较低的转动温度接近气体温度, 而较高的振动温度则表明氮分子的振动激发程度较高, 进一步说明了等离子体中电子-振动(E-V)能量转移效率较高。高振动温度意味着分子振动激发态布居较高, 等离子体中的振动温度显著高于转动温度, 表明这是典型的低温非平衡等离子体^[20-21]。

图 6 显示了表面空气放电产生的气相长寿命活性粒子的组成与电极表面温度的关系。放电初期(1 min), 电极表面温度持续上升(约 100 °C), 在 1 000~1 100 cm^{-1} 范围内出现 1 个强而宽的吸收峰, 对应 O_3 的不对称伸缩振动峰, 表明此时以 O_3 生成为主导, 处于典型的臭氧放电模式。随放电进行至 2 min 40 s, 臭氧吸收峰强度逐渐减弱, 但在 1 600 cm^{-1} 附近出现了 NO_2 的特征吸收峰, 表明放电由臭氧模式向氮氧化物模式转变。当放电至 5 min 时, 电极表面温度已超过 140 °C, O_3 吸收峰几乎消失, 而 NO_2 吸收峰显著增强, 并在 1 240、1 720 和 1 760 cm^{-1} 处出现了 N_2O_5 的特征吸收峰, 表明在高温条件下放电模式已完全转变为氮氧化物模式。图 6 最后定量展示了 6 种活性粒子吸光度的动态变化规律。在放电初期(0~2 min 40 s), 电极温度从室温逐渐升至约 140 °C, O_3 吸光度迅速上升并达到最大值, 而其余粒子浓度均较低, 表明在电极温度上升过程中, O_2 在高能电子轰击下发生解离, 生成的 O 原子与 O_2 三体碰撞形成 O_3 。当电极温度稳定在 140 °C (2 min 40 s~5 min), 体系进入一个关键的转变阶段: O_3 吸光度急剧下降至接近于 0, NO_2 和 N_2O_5 吸光度迅速上升并在 5 min 达到峰值, 而 NO 、 N_2O 和 HNO_3 吸光度缓慢上升。以上结果表明, 空气等离子体放电过程伴随大量活性粒子的产生, 其演变遵循明确的温度依赖规律。放电过程可分为 2 个特征阶段: 低温臭氧主导阶段和高温氮氧化物主导阶段。在放电初期(<100 °C), 体系中的化学反应主要由高能电子与氧气分子的相互作用主导。具体而言, 高能电子首先与 O_2 发生碰撞解离反应, 产生的氧原子随后与氧气分子发生三体碰撞反应(其中 M 为第三体), 这一过程促进了 O_3 的快速积累, 使其浓度在短时间内达到峰值(反应(1)~(2))。随着放电持续进行, 电极表面温度升高(>100 °C), 体系的反应特性发生转变, 在这一温度区间, 氮气的解离和激发变得更加

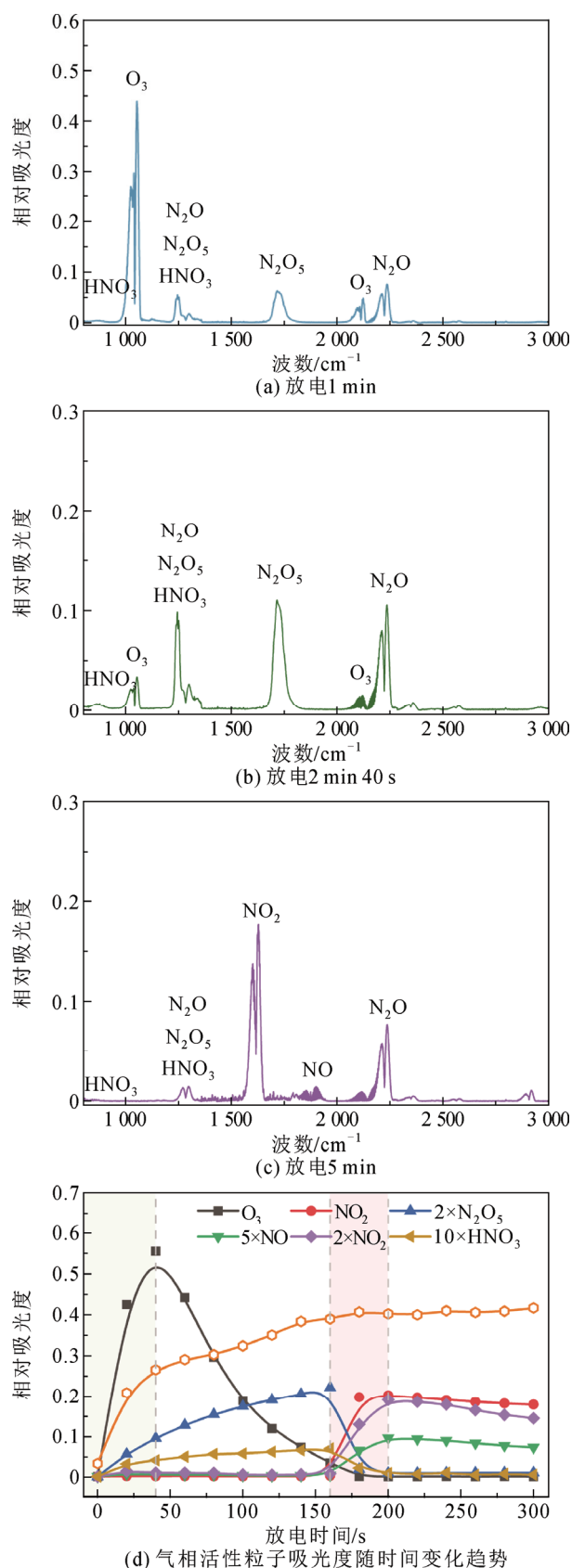
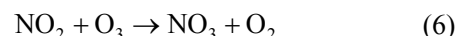
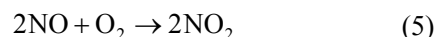
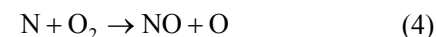
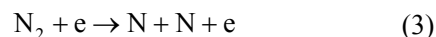
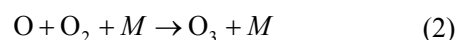
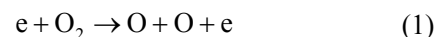


图6 不同放电时间下 FTIR 光谱和关键气相活性粒子演变规律

Fig.6 FTIR spectra and aqueous species evolution during discharge time

显著。所产生的活性氮原子与氧气发生反应生成 NO, 继而 NO 被进一步氧化形成 NO₂、N₂O₅ 和 HNO₃ 等含氮氧化物。此外, 在高温条件下, NO 还可与处于激发态的 N 原子反应生成 N₂O^[22]。同时, O₃ 与 NO 等的相互反应使其浓度逐渐下降, 而 NO 的氧化又进一步促进了 NO₂ 和 N₂O₅ 的形成^[23]。这种温度诱导的放电模式转变反映了等离子体化学反应网络中不同反应通道的选择性激活。低温条件 (<100 °C) 有利于维持以臭氧生成为主的反应链, 而高温环境 (>140 °C) 则促进了氮氧化物的生成和转化反应。



2.5 等离子体活化水的理化特性

PAW 的理化特性主要通过 pH 值、电导率和氧化还原电位 3 个关键参数进行表征^[24]。pH 值是描述溶液酸碱性的关键指标, 影响化学反应的速率、平衡、产物以及反应机理, 决定了 PAW 的化学活性和其在特定应用中的作用。图 7(a)展示了 PAW 在不同放电时间下的 pH 值变化趋势。初始 pH 值接近中性(约为 7), 随着放电时间的增加, pH 值迅速下降, 在 1 min 后就小于 3, 并且随着时间增加而进一步降低。这种下降趋势表明放电过程中 NO_x 的溶解导致水溶液酸化(化学反应(9)—(13))^[25], 产生硝酸、亚硝酸和其他含氮氧化物, 使得 PAW 的酸性增强。电导率衡量溶液中离子浓度和导电能力, 是反映 PAW 总体离子浓度的重要指标。图 7(b)显示了电导率随放电时间的变化趋势。PAW 的电导率与放电时间呈现良好的线性正相关性。这种变化趋势说明在等离子体活化过程中, 气相活性粒子持续向液相转移并发生离子化, 使得 PAW 中积累了大量具有氧化还原活性 RONS, 总 RONS 代表的计量呈现时间累积效应。氧化还原电位是表征溶液氧化还原能力的核心指标, 其数值越高, 表明溶液的氧化性越强。由图 7(c)可知, PAW 的 ORP 值在放电初期(<1 min)快速上升, 达到约 600 mV 的较高水平后趋于稳定。高的 ORP 值不仅赋予 PAW 强大的氧化

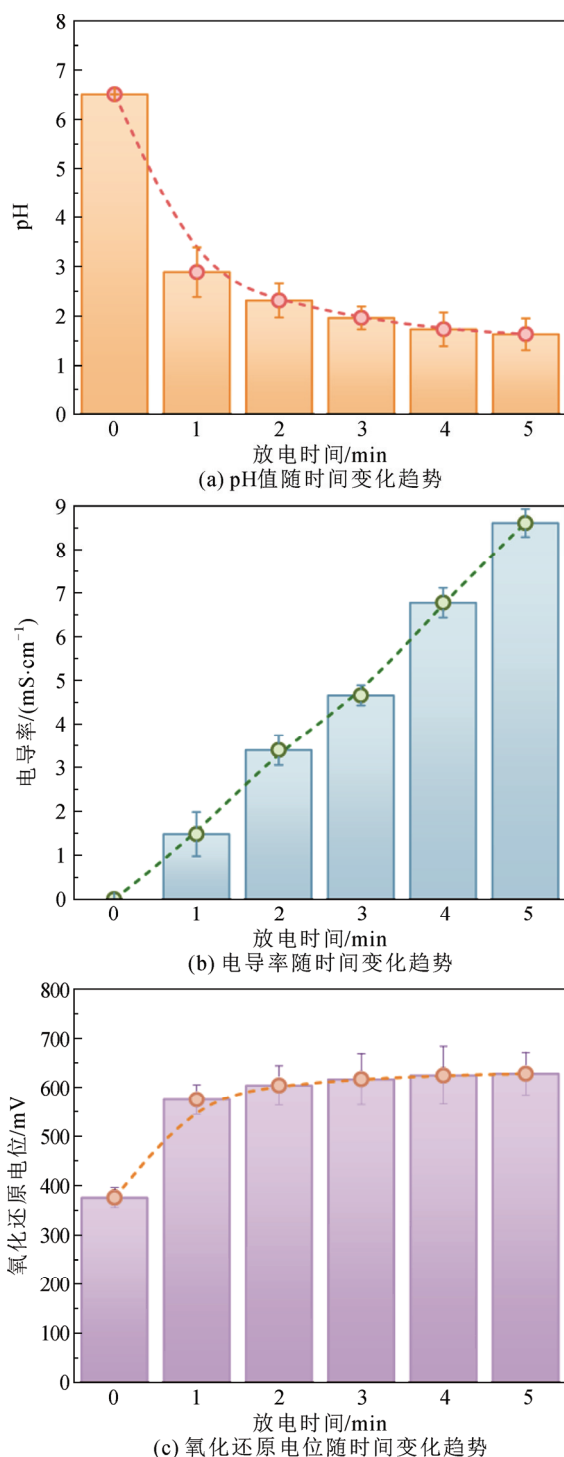
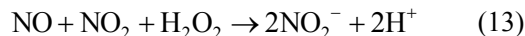
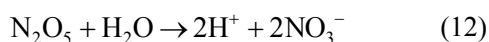
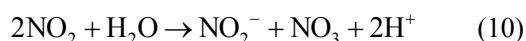
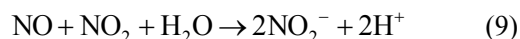


图7 PAW的理化特性随时间变化规律

Fig.7 Time-dependent variations in physicochemical properties of PAW

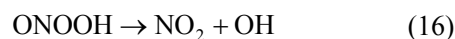
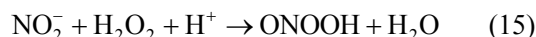
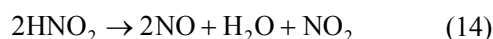
能力, ORP 值的最终趋稳现象则反映了活性氧粒子的生成与消耗达到了动态平衡状态。



2.6 液相活性粒子

为深入理解 PAW 中活性粒子的变化规律, 本研究对其主要活性组分的浓度变化进行了系统表征。图 8(a)展示了 H_2O_2 和 NO_2^- 浓度随放电时间的变化趋势。 H_2O_2 浓度在放电初期(0~2 min)快速积累, 由初始值上升至约 $180 \mu\text{mol/L}$ 的最大值, 随后出现拐点并逐渐降低, 最终在 5 min 时降至约 $100 \mu\text{mol/L}$; 而 NO_2^- 浓度在 0~3 min 内增至约 $210 \mu\text{mol/L}$, 此后转而下降, 在 5 min 时降至约 $50 \mu\text{mol/L}$ 。图 8(b)显示, $\text{ONOO}^-/\text{O}_2^-$ 的总浓度同样呈现先升后降的变化特征, 在 3 min 左右达到最大值(约 $80 \mu\text{mol/L}$), 随后快速下降并在 5 min 时降至约 $50 \mu\text{mol/L}$ 。

液相活性粒子变化的趋势与放电模式的转变息息相关, 在放电前 3 min 时, 在臭氧模式下 PAW 属于初始生成阶段, 活性粒子浓度逐渐升高。进入氮氧化物模式后, 活性粒子间二次反应逐渐增强, 稳定的 HNO_2 进一步分解生成 NO 和 NO_2 气体(反应(14))^[26]。溶液中共存的 NO_2^- 和 H_2O_2 可经由反应(15)转化为 ONOOH ^[27], 这是 HNO_3 的一种不稳定异构体(反应(16)), 在酸性环境下 70% 的 ONOOH 会被转化为稳定的 HNO_3 退出 RONS 循环网络(见反应(17))^[28]。



2.7 存储条件对 PAW 活性粒子的影响

PAW 虽具有较高的化学活性, 但其 RONS 之间的相互作用导致稳定性较差, 这严重制约了其在临床治疗和商业应用中的推广。目前, 降低储存温度以抑制化学反应速率是最常用的稳定化策略, 然而对 pH 值这一影响化学反应的关键因素的研究尚显不足。

图 9 给出了不同 pH 值(4、6、7、8 和 10)条件下 PAW 中 RONS 的储存稳定性研究结果。

实验数据表明, pH 值对各类 RONS 的稳定性表现出显著的调控作用, 且不同 RONS 对 pH 的响应特征存在明显差异。具体而言, H_2O_2 在中性条件($\text{pH}=7$)下表现出最佳的储存稳定性, 历经 168 h 储存后, 其浓度仍维持在 $60 \mu\text{mol/L}$ 左右, 仅较初始

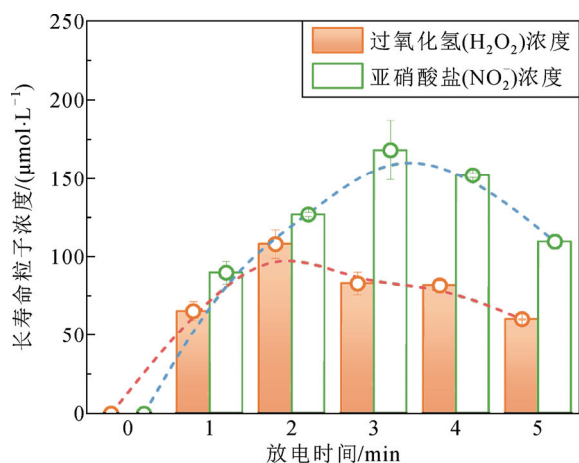
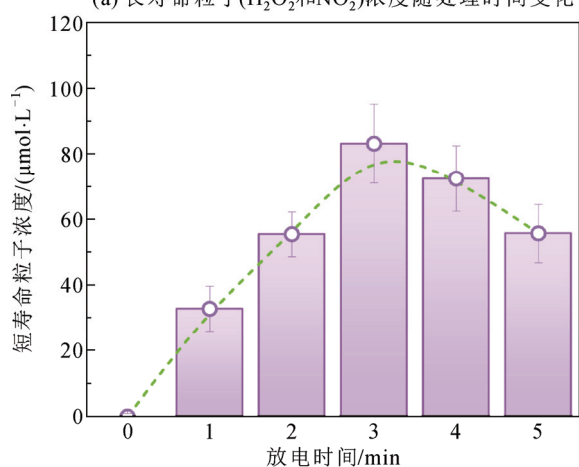

 (a) 长寿命粒子(H_2O_2 和 NO_2^-)浓度随处理时间变化

 (b) 短寿命粒子($\text{ONOO}^-/\text{O}_2^-$)浓度随处理时间变化

图 8 活性粒子浓度随处理时间变化

Fig.8 Aqueous RONS concentration with treatment time

值降低 27%。 NO_2^- 则在碱性环境($\text{pH}=10$)下最为稳定, 168 h 后保持约 $90 \mu\text{mol/L}$ 的浓度水平, 相对于初始浓度($160 \mu\text{mol/L}$)的衰减幅度为 44%。类似地, $\text{ONOO}^-/\text{O}_2^-$ 在碱性条件下也表现出较高的稳定性, 当 $\text{pH}=10$ 时, 经 72 h 储存后的浓度约为 $30 \mu\text{mol/L}$, 显著高于酸性条件($\text{pH}=4$)下的残留浓度(约 $6 \mu\text{mol/L}$)。

PAW 中活性粒子的动态平衡是一个复杂的系统, 活性粒子的浓度受到整个化学网络中生成途径和分解途径双向影响, 当等离子体活化终止, 分解路径会逐渐成为主导, 活性粒子浓度随之下降。然而, pH 值可通过影响关键化学反应步骤来调节这一过程: 在碱性条件下, NO_2^- 和 ONOO^- 的质子化反应(生成 HNO_2 和 ONOOH)及其后续的歧化反应被有效抑制, 从而减少了 RONS 向气态产物(如 NO 和 NO_2)的转化及其向惰性 NO_3^- 的转变(反应式 14)——(17))。值得注意的是, 虽然碱性环境中 OH^- 可促进 H_2O_2 的分解^[29], 但在酸性条件下 NO_2^- 对 H_2O_2 的持续消耗更为显著。因此, 中性 pH 环境为 H_2O_2 提供

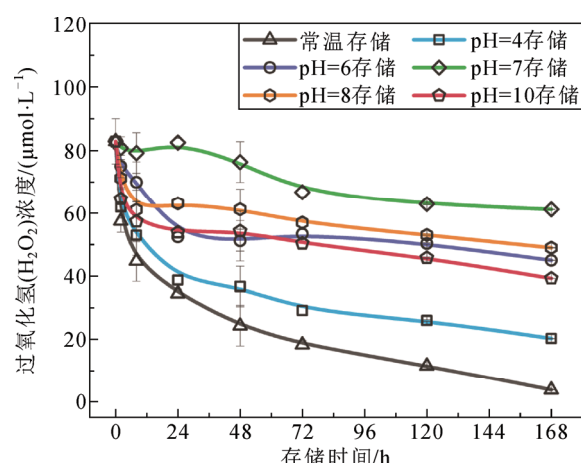
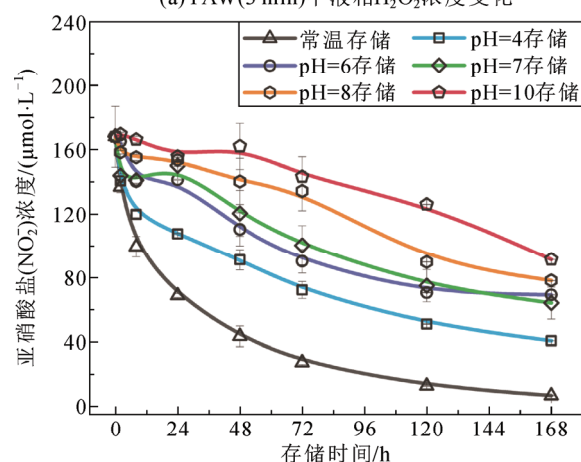
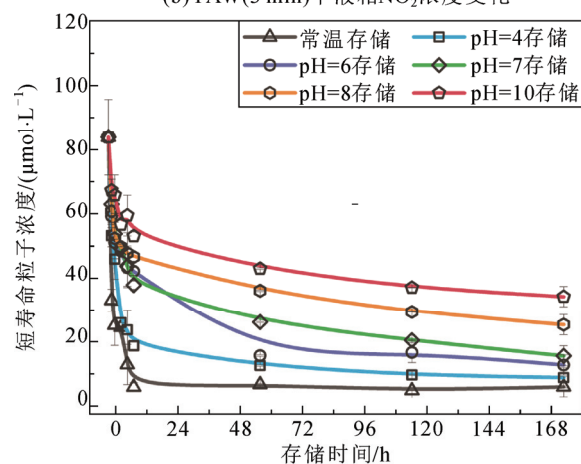

 (a) PAW(3 min)中液相 H_2O_2 浓度变化

 (b) PAW(3 min)中液相 NO_2^- 浓度变化

 (c) PAW(3 min)中液相($\text{ONOO}^-/\text{O}_2^-$)浓度变化

图 9 PAW (3 min)中 RONS 在不同存储条件下浓度变化

Fig.9 Aqueous RONS concentration changes in PAW (3 min) under different storage conditions

了最适宜的化学稳定性条件。

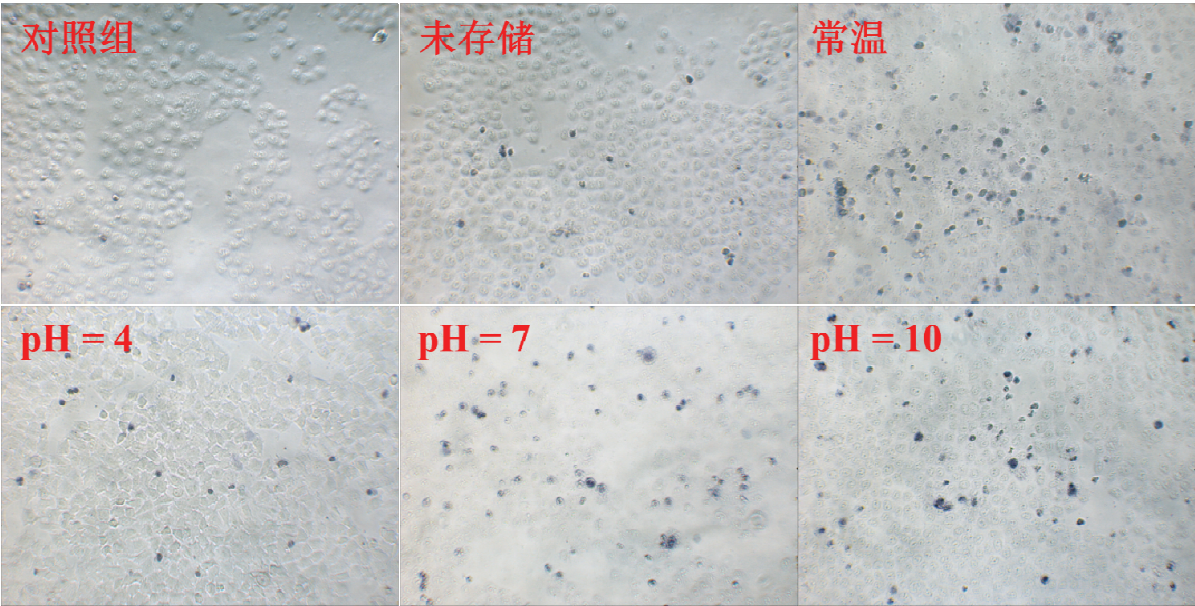
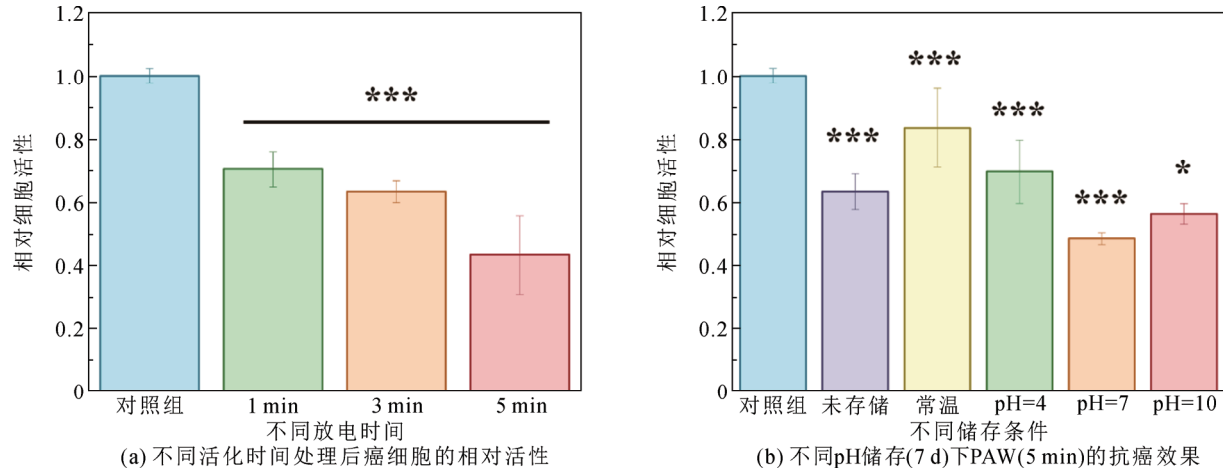
基于上述研究结果可知, PAW 中 RONS 的稳定性受到 pH 值的精确调控。酸性条件通过促进 NO_2^- 的歧化反应和 RONS 的转化过程, 加速了其浓度衰减; 而非酸性环境则通过抑制这些反应途径, 有效延缓了 RONS 的衰减。这一发现为 PAW 的实际应

用提供了重要的优化策略——通过调控储存 pH 值可显著提升 PAW 中 RONS 的稳定性,进而保存其生物活性。

2.8 等离子体活化水抗癌活性的研究

为阐明 PAW 的制备条件和储存方式对其抗癌活性的影响规律,本研究系统考察了活化时间和储存 pH,这 2 个关键参数对 PAW 抗癌效果的调控作用(见图 10)。实验结果表明,PAW 的抗癌活性强度与其放电时间和储存条件呈现显著的相关性。就活化时间的影响而言(见图 10(a)),PAW 对癌细胞的抑制作用随活化时间延长而增强^[30]。具体表现为:与对照组相比,经 1、3、5 min 活化处理的 PAW 作用后,癌细胞的存活率分别降至 70%、63%、44%。这种抗癌活性随活化时间延长而增强的现象表明,PAW 的抗癌效应不仅仅取决于关键 RONS 浓度,更

与总 RONS 的累积和溶液 pH 值密切相关,两者的协同作用构成了 PAW 抗癌的剂量-效应。对储存条件的研究结果显示(见图 10(b)),经 pH 值调控(pH=4、7 和 10)并储存 7 d 后的 PAW(5 min)样品在统一调节至初始酸碱度条件下表现出不同的抗癌效果。实验数据表明,pH=4、7 和 10 条件下储存的 PAW 处理后,癌细胞存活率分别为 70%、49%和 56%。其中,中性条件(pH=7)下储存的 PAW 表现出最强的抗癌活性,其效果接近新鲜制备的 PAW 水平。这一结果与前述 RONS 稳定性研究(见图 9)结果相互印证,进一步确认了中性环境对维持关键 RONS(尤其是 H₂O₂)稳定性的重要作用。通过系统比较不同储存策略的保活效果可知,pH 调控方法在维持 PAW 抗癌活性方面优于温度调控策略。经 pH 调控(pH=4 或 10)并储存 7 d 后的 PAW 仍保持显著



(c)不同 pH 值条件下储存 7 d 后 PAW(5 min)处理癌细胞台盼蓝染色图片

图 10 PAW 的抗癌效应

Fig.10 Anticancer effects of PAW

的抗癌活性, 明显优于常温储存条件下的结果。这种差异主要源于 pH 值对 RONS 稳定性的直接化学调控作用, pH 调控能从反应本质上稳定 RONS 的化学形态, 从而提供更持久的保护效果。在现有文献中, PAW 的抗癌效力在室温或普通冷藏条件下会随时间迅速衰减, 冷冻(尤其是 -80°C)可较好维持其活性。Fan 等人发现, 新鲜活化液使 A549 细胞存活率降至 23%, 而室温储存 7 d 后升至 61%, -80°C 储存则保持 30% 的存活率。与通过降低分子热运动来减缓 RONS 衰减的低温储存策略相比, pH 调控能从反应本质上稳定 RONS 的化学形态, 从而提供更持久的保护效果。

3 结论

1) 空气表面放电过程中, 随着电极温度升高超过 140°C , 放电模式由臭氧主导型向氮氧化物主导型转变, 这一转变导致 PAW 中活性氧氮粒子 NO_2^- 和 H_2O_2 等活性粒子浓度呈现先升后降的变化趋势。

2) pH 值是调控 PAW 活性粒子稳定性的关键因素。在中性和碱性条件下储存可显著延长活性粒子的寿命, 在 $\text{pH}=7$ 条件下, H_2O_2 浓度下降最慢; 而在 $\text{pH}=10$ 条件下, NO_2^- 和 $\text{ONOO}^-/\text{O}_2^-$ 浓度下降最慢。

3) 通过建立“中性/碱性储存-酸性激活”的 pH 调控新策略, 可在常温条件下实现 PAW 活性粒子的高效储存, 中性储存 7 d 后的 PAW 还能维持 61% 的癌细胞灭活效果, 这种基于化学平衡调控的储存方法为开发稳定、高效的 PAW 提供了新思路, 对推动等离子体活化水在肿瘤治疗等生物医学领域的应用具有重要意义。

参考文献 References

- [1] LIU Z J, LI X, GUO H Z, et al. Enhancing the synergistic effect by introducing Cu(II)-PMS into the underwater bubble plasma treatment process for efficient degradation of emerging contaminants in water[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 507: 160480.
- [2] 周仁武, 屈仲平, 孙 静, 等. 大气压低温等离子体固氮技术研究进展[J]. 高电压技术, 2023, 49(9): 3640-3653.
ZHOU Renwu, QU Zhongping, SUN Jing, et al. Recent progress of atmospheric-pressure low-temperature plasma-enabled nitrogen fixation technology[J]. High Voltage Engineering, 2023, 49(9): 3640-3653.
- [3] GAO Y W, FRANCIS K, ZHANG X H. Review on formation of cold plasma activated water(PAW)and the applications in food and agriculture[J]. Food Research International, 2022, 157: 111246.
- [4] 郭 莉, 赵鹏瑜, 黄玲玲, 等. 等离子体活化水用于微生物消杀的意义和现状[J]. 高电压技术, 2024, 50(7): 2955-2971.
GUO Li, ZHAO Pengyu, HUANG Lingling, et al. Significance and current status of plasma-activated water for microbial inactivation[J]. High Voltage Engineering, 2024, 50(7): 2955-2971.
- [5] 刘志杰, 陈 旻, 刘定新. 大气压冷等离子体的理化特性检测方法综述[J]. 高电压技术, 2022, 48(10): 4196-4214.
LIU Zhijie, CHEN Min, LIU Dingxin. Review of detection methods for physicochemical characteristics of atmospheric pressure cold plasma[J]. High Voltage Engineering, 2022, 48(10): 4196-4214.
- [6] 文 韬, 向念文, 章 程, 等. 高压放电等离子体研究现状及发展趋势[J]. 高电压技术, 2023, 49(8): 3226-3239.
WEN Tao, XIANG Nianwen, ZHANG Cheng, et al. Research status and development trend of high voltage discharge plasma[J]. High Voltage Engineering, 2023, 49(8): 3226-3239.
- [7] CHEN B H, LIU Z J, ZHANG M Y, et al. Array hollow-anode micro-second-pulsed plasma jets at atmospheric pressure: mode transition and influencing factors[J]. Plasma Sources Science and Technology, 2024, 33(11): 11LT02.
- [8] PANG B L, LIU Z J, WANG S T, et al. Discharge mode transition in a He/Ar atmospheric pressure plasma jet and its inactivation effect against tumor cells *in vitro*[J]. Journal of Applied Physics, 2021, 130(15): 153301.
- [9] 满晨曦, 黄邦斗, 章 程, 等. 不同脉冲参数下等离子体活化水活性氮特性[J]. 高电压技术, 2022, 48(6): 2326-2335.
MAN Chenxi, HUANG Bangdou, ZHANG Cheng, et al. Reactive nitrogen species characteristic of plasma-activated water under different pulsed parameters[J]. High Voltage Engineering, 2022, 48(6): 2326-2335.
- [10] LI Y Q, LIU J L, ZHAO F, et al. Plasma-activated ethanol solution and its decontamination effect[J]. High Voltage, 2023, 8(4): 833-840.
- [11] WANG S T, LIU Z J, PANG B L, et al. Plasma-activated water: physicochemical properties and applications in bacterial inactivation[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2022, 55(18): 185202.
- [12] PANG B L, LIU Z J, ZHANG H Y, et al. Investigation of the chemical characteristics and anticancer effect of plasma-activated water: the effect of liquid temperature[J]. Plasma Processes and Polymers, 2022, 19(1): e2100079.
- [13] SHEN J, TIAN Y, LI Y L, et al. Bactericidal effects against *S. aureus* and physicochemical properties of plasma activated water stored at different temperatures[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 28505.
- [14] ZHOU R W, ZHOU R S, PRASAD K, et al. Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxynitrite[J]. Green Chemistry, 2018, 20(23): 5276-5284.
- [15] WANG Y L, WATERHOUSE G I N, SHANG L, et al. Electrocatalytic oxygen reduction to hydrogen peroxide: from homogeneous to heterogeneous electrocatalysis[J]. Advanced Energy Materials, 2021, 11(15): 2003323.
- [16] IKAWA S, KITANO K, HAMAGUCHI S. Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application[J]. Plasma Processes and Polymers, 2010, 7(1): 33-42.
- [17] PANG B L, LIU Z J, GAO Y T, et al. Enhanced anticancer efficacy of alkaline plasma-activated water through augmented RONS production[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2025, 17(1): 467-483.
- [18] 许桂敏, 穆海宝, 林芳妃, 等. 基于印刷电路板的沿面型介质阻挡放电特性[J]. 高电压技术, 2022, 48(9): 3784-3793.
XU Guimin, MU Haibao, LIN Fangfei, et al. Characteristics of surface dielectric barrier discharge based on a printed circuit board[J]. High Voltage Engineering, 2022, 48(9): 3784-3793.
- [19] EL-ZEER D M, DAWOOD N, ELAKSHAR F, et al. The influence of the addition of argon gas to air DB discharge[J]. The European Physi-

- cal Journal: Applied Physics, 2012, 58(3): 30801.
- [20] LIU Z J, WANG S T, PANG B L, et al. The impact of surface-to-volume ratio on the plasma activated water characteristics and its anticancer effect[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2021, 54(21): 215203.
- [21] COLONNA G, PINTASSILGO C D, PEGORARO F, et al. Theoretical and experimental aspects of non-equilibrium plasmas in different regimes: fundamentals and selected applications[J]. The European Physical Journal D, 2021, 75(6): 183.
- [22] HERRON J T, GREEN D S. Chemical kinetics database and predictive schemes for nonthermal humid air plasma chemistry. Part II. Neutral species reactions[J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2001, 21(3): 459-481.
- [23] EOM I S, KANG H Y, KWON S K. Plasma diagnosis and biomedical application using linear microwave atmospheric-pressure plasma generator[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2020, 48(9): 3054-3060.
- [24] 赵航, 孙宇豪, 张波, 等. 空气等离子体射流特性及其活化水灭菌效果[J]. 高电压技术, 2023, 49(12): 5270-5281.
ZHAO Hang, SUN Yuhao, ZHANG Bo, et al. Characteristics of air plasma jet and inactivation efficacy of plasma activated water[J]. High Voltage Engineering, 2023, 49(12): 5270-5281.
- [25] 齐志华, 谭一航, 孟广伊, 等. 大气压垂直流动液体地电极制备等离子体活化溶液的理化特性[J]. 高电压技术, 2024, 50(1): 441-449.
QI Zhihua, TAN Yihang, MENG Guangyi, et al. Physicochemical properties of plasma activated liquid generated by an atmospheric pressure vertical falling liquid ground electrode[J]. High Voltage Engineering, 2024, 50(1): 441-449.
- [26] VOLKOV A G, BOOKAL A, HAIRSTON J S, et al. Mechanisms of multielectron reactions at the plasma/water interface: interfacial catalysis, RONS, nitrogen fixation, and plasma activated water[J]. Electrochimica Acta, 2021, 385: 138441.
- [27] MA M Y, ZHANG Y Z, LV Y, et al. The key reactive species in the bactericidal process of plasma activated water[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2020, 53(18): 185207.
- [28] LIU K Y, SHANG H M, KONG X Q, et al. A novel near-infrared fluorescent probe for H_2O_2 in alkaline environment and the application for H_2O_2 imaging *in vitro* and *in vivo*[J]. Biomaterials, 2016, 100: 162-171.
- [29] CHENG H, LUO J Y, SONG K, et al. On the dose of plasma medicine: plasma-activated medium(PAM)and its effect on cell viability[J]. Physics of Plasmas, 2022, 29(6): 063506.
- [30] FAN R Z, ZHAO X Y, QI M, et al. Properties and anticancer effects of plasma-activated medium stored at different temperatures[J]. AIP Advances, 2022, 12(9): 095022.



PANG Bolun
Ph.D. candidate

庞波伦

1997—, 男, 博士生
主要研究方向为等离子体生物医学
E-mail: pangbolun@xjtu.edu.cn



GAO Yuting
Ph.D. candidate

高钰婷

1996—, 女, 博士生
主要研究方向为等离子体能源环境应用
E-mail: gaoyutinger@163.com



LIU Zhijie
Ph.D.
Associate professor
Corresponding author

刘志杰(通信作者)

1987—, 男, 博士, 副教授
主要从事等离子体源开发与诊断、等离子体生物医学与能源环境应用
E-mail: liuzhijie@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期 2025-01-24 修回日期 2025-04-26 编辑 曾文君