

可逆荧光探针用于亚硫酸根与双氧水检测的机制研究

阚宇莹, 庞楚璇*

锦州医科大学附属第一医院, 辽宁 锦州

收稿日期: 2026年1月23日; 录用日期: 2026年2月19日; 发布日期: 2026年2月28日

摘要

亚硫酸根(SO_3^{2-})与双氧水(H_2O_2)作为生物体内重要的活性氧与活性硫物种,其浓度变化与多种生理病理过程密切相关。开发高选择性、高灵敏度的检测方法对生物医学研究具有重要意义。本文通过理论计算系统研究了两种可逆荧光探针(probe-a和probe-b)检测 SO_3^{2-} 与 H_2O_2 的作用机制。结果表明,probe-a分子的最高占据分子轨道(HOMO)与最低未占据分子轨道(LUMO)均匀分布于整个分子结构,表现出明显的局域激发特性,在激发后产生较强的红色荧光(振子强度 $f=0.86$);而probe-b经 SO_3^{2-} 作用后,HOMO与LUMO发生空间分离,分别定位于 SO_3 基团和分子主体部分,呈现典型的电荷转移激发特性,导致荧光强度显著减弱(振子强度 $f=0.01$)。平均局部离子化能(ALIE)分析证实,probe-b中 SO_3 基团具有强还原反应活性,是与 H_2O_2 发生氧化还原反应的关键位点。电子转移热图清晰展示了两种探针在激发过程中的电荷分布变化,为理解荧光响应机制提供了直接的理论依据。该研究不仅揭示了可逆荧光探针的设计原理,还为开发新型活性物种检测探针提供了重要的参考。

关键词

可逆荧光探针, 亚硫酸根, 双氧水, 电荷转移, 局域激发

Mechanism Study on Reversible Fluorescent Probes for the Detection of Sulfite and Hydrogen Peroxide

Yuying Kan, Chuxuan Pang*

The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning

Received: January 23, 2026; accepted: February 19, 2026; published: February 28, 2026

*通讯作者。

文章引用: 阚宇莹, 庞楚璇. 可逆荧光探针用于亚硫酸根与双氧水检测的机制研究[J]. 自然科学, 2026, 14(2): 137-145.
DOI: 10.12677/ojns.2026.142016

Abstract

Sulfite (SO_3^{2-}) and hydrogen peroxide (H_2O_2), as important reactive oxygen species and reactive sulfur species in organisms, their concentration changes are closely related to various physiological and pathological processes. Developing detection methods with high selectivity and sensitivity is of great significance for biomedical research. In this paper, the action mechanism of two reversible fluorescent probes (probe-a and probe-b) for the detection of SO_3^{2-} and H_2O_2 was systematically studied by theoretical calculations. The results showed that the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) of probe-a molecule are uniformly distributed in the entire molecular structure, showing obvious local excitation characteristics, and strong red fluorescence is generated after excitation (oscillator strength $f = 0.86$). After probe-b is acted on by SO_3^{2-} , HOMO and LUMO are spatially separated, locating in the SO_3 group and the main molecular part respectively, showing typical charge transfer excitation characteristics, leading to a significant decrease in fluorescence intensity (oscillator strength $f = 0.01$). Average Local Ionization Energy (ALIE) analysis confirmed that the SO_3 group in probe-b has strong reductive reaction activity and is the key site for redox reaction with H_2O_2 . The electron transfer heat map clearly shows the changes in charge distribution of the two probes during the excitation process, providing a direct theoretical basis for understanding the fluorescence response mechanism. This study not only reveals the design principle of reversible fluorescent probes, but also provides an important reference for the development of new probes for the detection of reactive species.

Keywords

Reversible Fluorescent Probe, Sulfite, Hydrogen Peroxide, Charge Transfer, Local Excitation

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)与活性硫(Reactive Sulfur Species, RSS)是生物体内一类具有高反应活性的小分子物种, 在细胞信号传导、氧化应激反应、新陈代谢调节等生理过程中发挥着不可或缺的作用。双氧水(H_2O_2)作为代表性的 ROS, 参与细胞内多种氧化还原反应, 其浓度失衡会导致 DNA 损伤、蛋白质氧化等氧化应激反应, 进而引发癌症、神经退行性疾病等多种疾病。亚硫酸根(SO_3^{2-})作为重要的 RSS, 在生物体内主要由亚硫酸盐还原酶催化生成, 具有抗氧化、解毒等生理功能, 同时其浓度异常也与炎症反应、心血管疾病等病理过程密切相关。此外, H_2O_2 与 SO_3^{2-} 之间存在相互作用, SO_3^{2-} 可通过氧化还原反应清除过量的 H_2O_2 , 维持体内氧化还原平衡。因此, 实现对生物体内 SO_3^{2-} 与 H_2O_2 的高选择性、高灵敏度检测, 对于深入研究其生理病理功能、疾病早期诊断具有重要的科学意义和应用价值[1]-[7]。

传统的 SO_3^{2-} 与 H_2O_2 检测方法包括滴定法、色谱法、电化学法等。滴定法操作简单但灵敏度较低, 难以满足微量检测需求; 色谱法具有较高的选择性和准确性, 但样品前处理复杂、检测周期长, 不适用于实时原位检测; 电化学法响应速度快, 但易受生物基质中其他电活性物质的干扰, 检测特异性有待提高。荧光探针技术凭借其高灵敏度、高选择性、实时原位检测、操作简便等优势, 已成为生物体内活性物种检测的重要手段。可逆荧光探针能够实现目标分析物的反复检测, 可动态监测分析物浓度变化, 在生

物医学研究中具有独特的优势。然而, 目前已报道的荧光探针在检测 SO_3^{2-} 与 H_2O_2 时, 仍存在荧光响应机制不明确、选择性不足、光稳定性较差等问题, 限制了其在生物体内的应用。因此, 设计新型可逆荧光探针并深入研究其检测机制, 对于推动荧光探针技术的发展具有重要意义[8]-[11]。

荧光探针通常由识别基团、荧光团和连接基团三部分组成。识别基团负责与目标分析物发生特异性相互作用, 如结合、氧化还原、水解等; 荧光团是产生荧光信号的核心部分, 其荧光性质(如荧光强度、荧光波长、荧光寿命等)会随着识别基团与目标分析物的相互作用而发生显著变化; 连接基团用于连接识别基团和荧光团, 其结构会影响探针的溶解性、生物相容性以及识别基团与荧光团之间的电子转移过程。

根据荧光响应机制的不同, 荧光探针可分为光诱导电子转移(Photoinduced Electron Transfer, PET)、分子内电荷转移(Intramolecular Charge Transfer, ICT)、荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)、局域激发(Local Excitation, LE)等类型。在 PET 机制中, 识别基团与目标分析物结合后, 会改变识别基团与荧光团之间的电子转移效率, 导致荧光增强或猝灭; 在 ICT 机制中, 目标分析物与识别基团的相互作用会引起荧光团分子内电荷分布的变化, 导致荧光波长发生红移或蓝移; FRET 机制则是基于两个荧光团之间的能量转移, 当目标分析物与探针作用后, 两个荧光团之间的距离或取向发生变化, 从而改变能量转移效率, 实现荧光信号的调控; LE 机制是指荧光团在激发后, 电子仅在荧光团分子内部发生跃迁, 其荧光性质主要受荧光团自身结构的影响[12]-[16]。

本研究的两种可逆荧光探针(probe-a 和 probe-b)以常见的荧光团为基础, 通过引入特定的识别基团实现对 SO_3^{2-} 与 H_2O_2 的特异性识别[17]。probe-a 未与 SO_3^{2-} 作用时, 其分子结构相对稳定, HOMO 与 LUMO 均匀分布于整个分子, 表现出 LE 特性, 产生较强的荧光; 当 probe-a 与 SO_3^{2-} 作用后, 生成 probe-b, 此时分子结构发生变化, HOMO 与 LUMO 发生空间分离, 表现出 ICT 特性, 导致荧光强度显著减弱; 当 probe-b 与 H_2O_2 作用后, SO_3 基团被氧化, 探针分子恢复为 probe-a 的结构, 荧光强度得以恢复, 从而实现对 SO_3^{2-} 与 H_2O_2 的可逆检测。

本研究的主要内容是通过理论计算(态密度分析、平均局部离子化能分析、电子转移热图分析等)揭示探针的荧光响应机制。具体为利用密度泛函理论(Density Functional Theory, DFT)和含时密度泛函理论(Time-Dependent Density Functional Theory, TD-DFT)进行理论计算, 分析 probe-a 和 probe-b 的态密度分布、平均局部离子化能、电子转移过程等, 揭示荧光响应机制。

2. 理论计算方法

所有理论计算均采用 Gaussian 16 程序包进行。采用密度泛函理论(DFT)中的 B3LYP 泛函和 def2tzvp 基组对 probe-a 和 probe-b 的基态几何结构进行优化。在优化后的几何结构基础上, 采用含时密度泛函理论(TD-DFT)中的 CAM-B3LYP 泛函和 def2tzvp 基组计算其激发态性质, 包括激发能、振子强度等[18][19]。以上计算过程中均采用水环境进行计算以便和实验结果进行对比。

态密度(Density of States, DOS)图用于分析 HOMO 与 LUMO 的分布情况, 通过 Multiwfn 3.7 程序对 Gaussian 计算结果进行处理得到。平均局部离子化能(Average Local Ionization Energy, ALIE)用于评估分子中不同区域的反应活性, 采用 B3LYP 泛函和 def2tzvp 基组计算得到。电子转移热图用于展示探针在激发过程中的电荷转移情况, 通过计算激发态与基态之间的电荷密度差得到[20]-[22]。

3. 结果与讨论

图 1 是可逆荧光探针检测亚硫酸根与双氧水机制示意图, 探针 probe-a 与 SO_3^{2-} 反应后生成探针 probe-b, 相反地探针 probe-b 与 H_2O_2 反应后生成探针 probe-a, 二者强烈的荧光强度对比使得二者成为检测亚

硫酸根与双氧水的有效荧光探针。probe-a 与 SO_3^{2-} 、probe-b 与 H_2O_2 的反应活化能均较低(均低于 60 KJ/mol), 满足室温下快速越过能垒、瞬时响应的动力学要求, 与实验中荧光信号快速增强/淬灭一致。

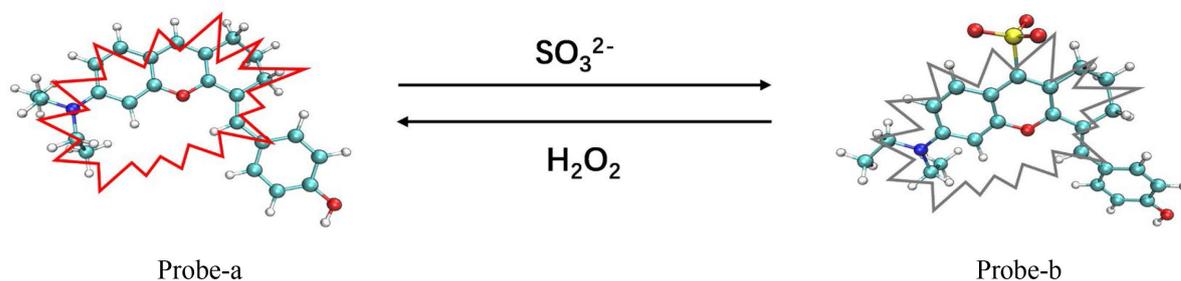


Figure 1. Schematic illustration of the detection mechanism of reversible fluorescent probes for sulfite (SO_3^{2-}) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Cyan: carbon; white: hydrogen; red: oxygen; blue: nitrogen; yellow: sulfur)

图 1. 可逆荧光探针检测亚硫酸根与双氧水机制示意图(靛色: 碳; 白色: 氢; 红色: 氧; 蓝色: 氮; 黄色: 硫)

态密度(DOS)图能够直观地展示分子中 HOMO 与 LUMO 的分布情况, 对于理解荧光响应机制具有重要意义。图 2 为 probe-a 的态密度图, 由图可知, probe-a 的 HOMO 与 LUMO 均匀分布于整个分子结构中, 没有明显的空间分离, 表现出典型的局域激发(LE)特性。在 LE 机制中, 电子在激发后仅在荧光团分子内部发生跃迁, 跃迁过程中电子与空穴的重叠程度较高, 振子强度较高, 因此 probe-a 表现出较强的荧光($f = 0.86$)。

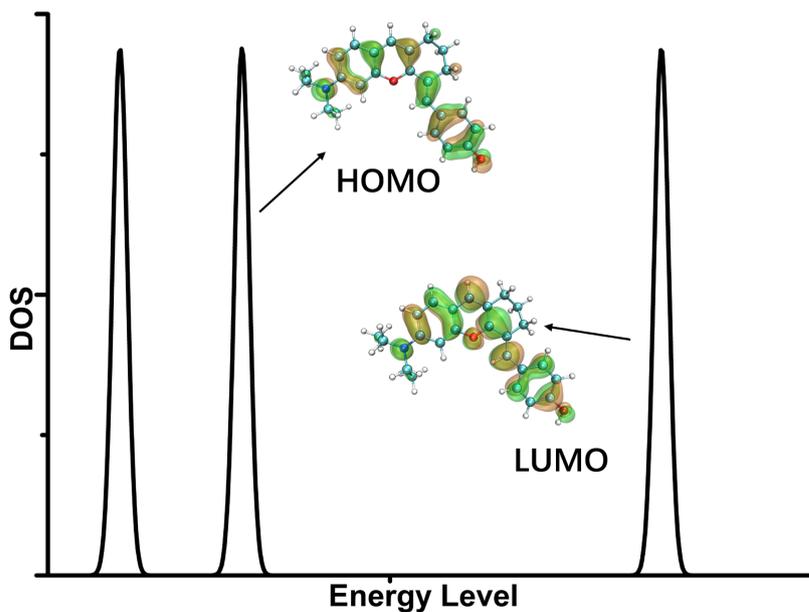


Figure 2. Density of States (DOS) plot of probe-a

图 2. 探针 probe-a 的态密度图

图 3 为 probe-b 的态密度图, 由图可知, probe-b 的 HOMO 主要分布于 SO_3 基团上, 而 LUMO 主要分布于分子主体部分(荧光团), HOMO 与 LUMO 发生了明显的空间分离, 表现出典型的分子内电荷转移(ICT)特性。在 ICT 机制中, 电子在激发后从 HOMO (SO_3 基团)转移至 LUMO (分子主体部分), 电子与空穴的重叠程度较低, 振子强度较低, 因此 probe-b 表现出较弱的荧光($f = 0.01$)。

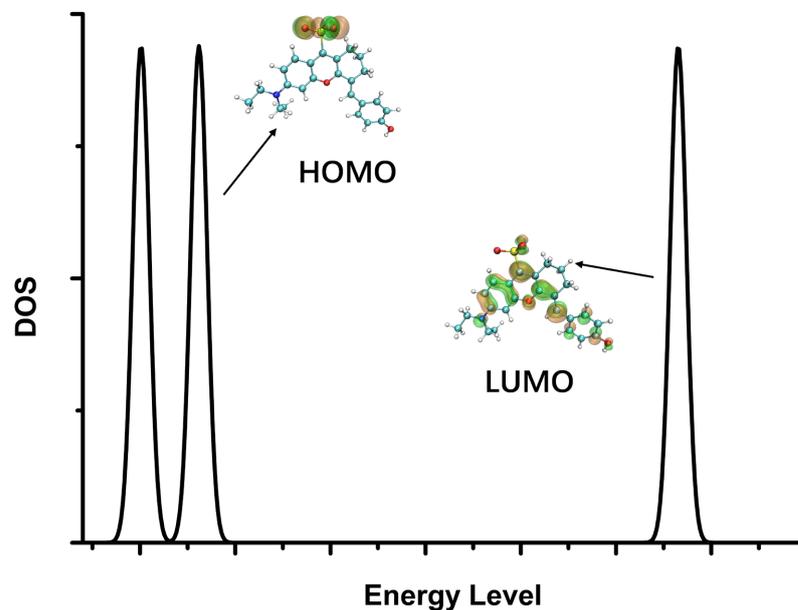


Figure 3. Density of states (DOS) plot of probe-b
图 3. 探针 probe-b 的态密度图

平均局部离子化能(ALIE)是评估分子中不同区域反应活性的重要参数, ALIE 值越低, 表明该区域的电子越容易被转移, 反应活性越高。图 4 为 probe-b 的 ALIE 图, 由图可知, 蓝色椭圆部分(SO₃ 基团)的 ALIE 值明显低于其他区域, 表明 SO₃ 基团具有强还原反应活性, 是与 H₂O₂ 发生氧化还原反应的关键位点。当 probe-b 与 H₂O₂ 作用时, SO₃ 基团被 H₂O₂ 氧化, 探针分子的结构恢复为 probe-a 的结构, HOMO 与 LUMO 重新均匀分布于整个分子, 荧光强度得以恢复。

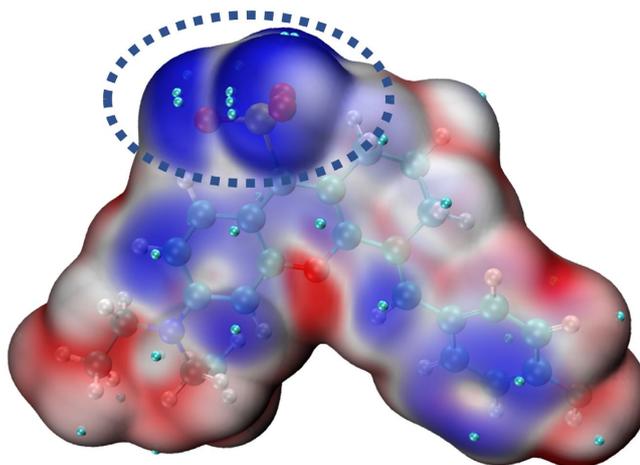


Figure 4. ALIE plot of probe-b
图 4. Probe-b 的 ALIE 图

电子转移热图能够清晰地展示探针在激发过程中的电荷转移情况, 颜色越深, 表明电荷富集程度越高。图 5 为 probe-a 由基态到第一激发态激发过程中的电子转移热图及其原子序号示意图, 由图可知, 电子与空穴主要集中在分子的另一区域, 没有明显的电荷转移现象, 表现出局域激发特性, 与态密度分析结果一致。

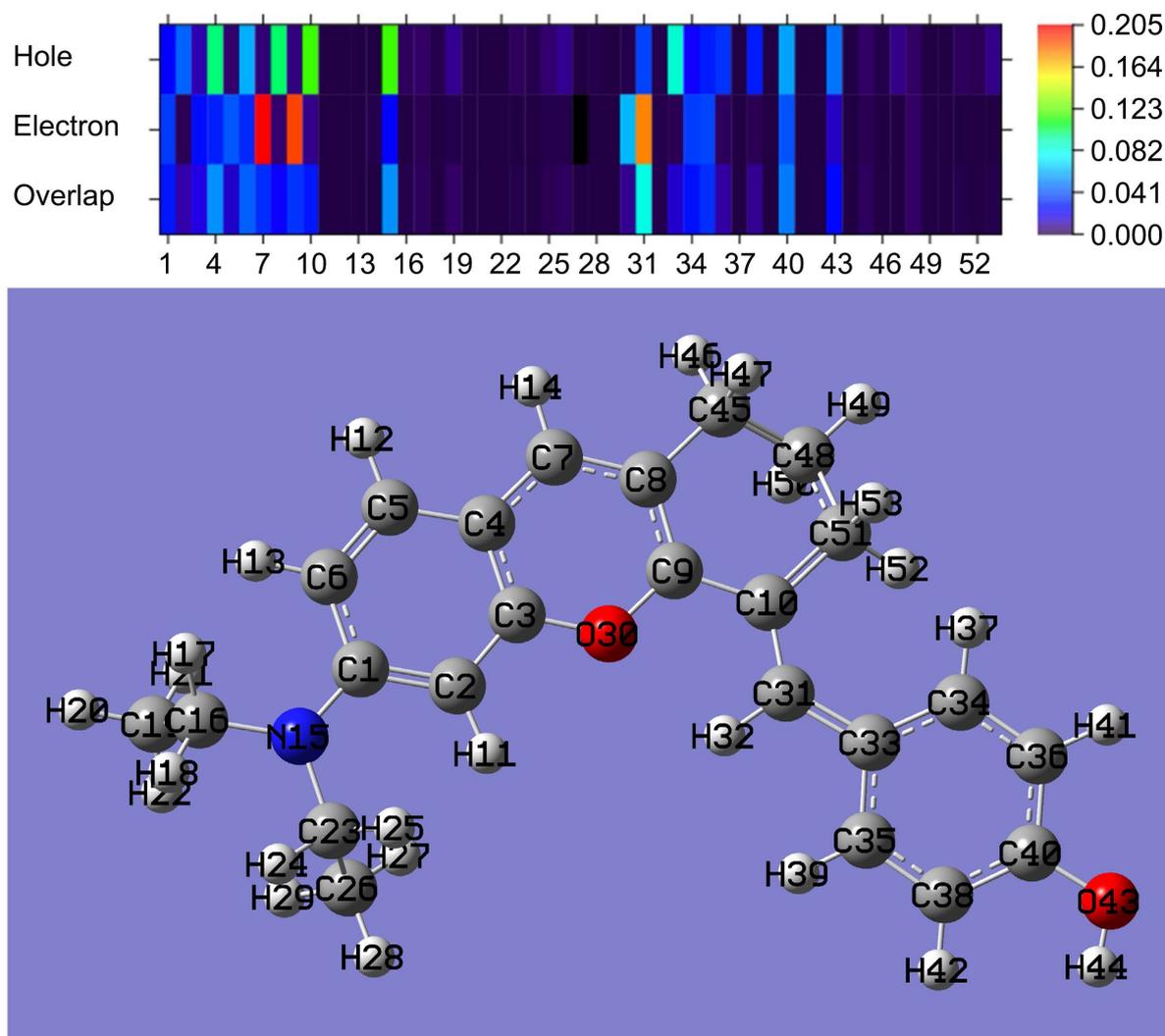
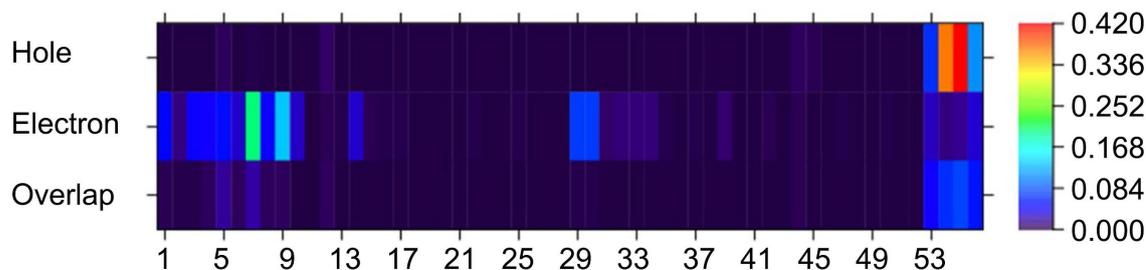


Figure 5. Heat map of electron transfer during excitation from the ground state to the first excited state of probe-a (upper panel) and the corresponding schematic diagram of atomic numbering (lower panel)
图 5. Probe-a 由基态到第一激发态激发过程中的电子转移热图(上图)及其原子序号示意图(下图)

图 6 为 probe-b 由基态到第一激发态激发过程中的电子转移热图及其原子序号示意图, 由图可知, 电子主要集中在 SO₃ 基团(红色区域), 空穴主要集中在分子主体部分(蓝色区域), 表现出明显的电荷转移现象, 与态密度分析结果一致。这种电荷转移导致电子与空穴的分离, 降低了振子强度, 从而使 probe-b 的荧光强度显著减弱。



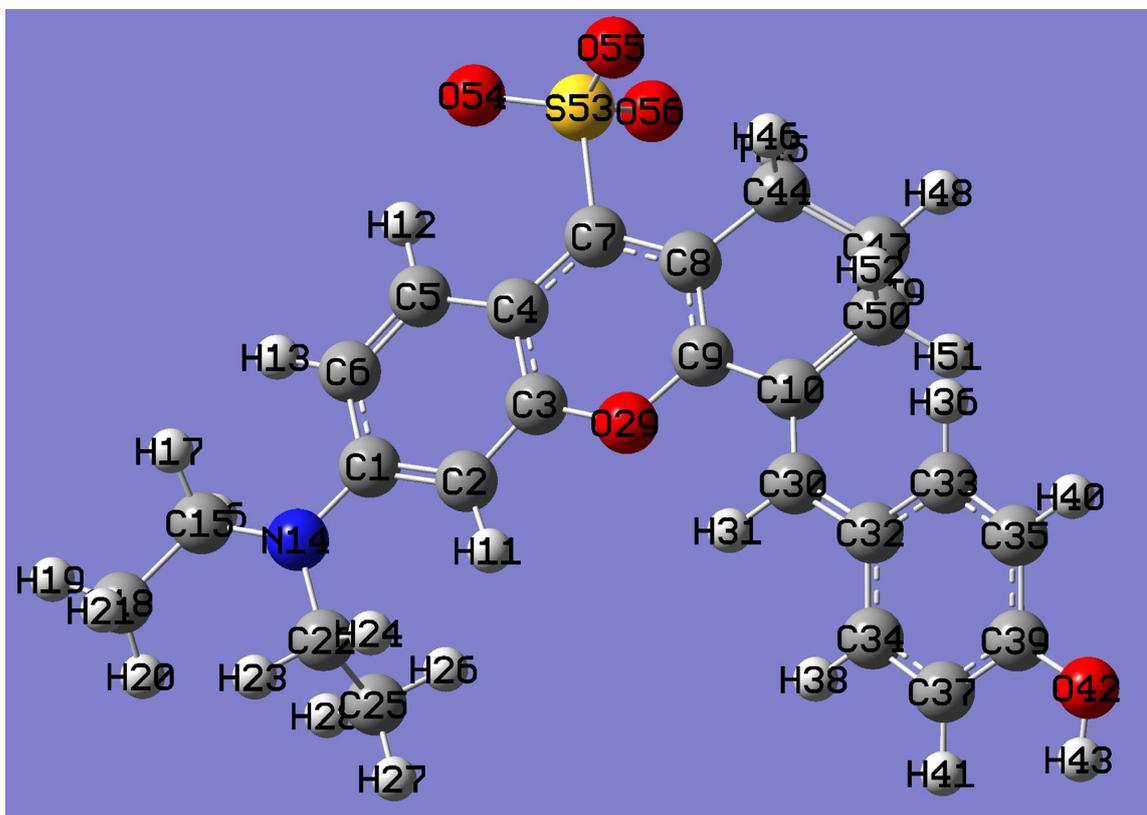


Figure 6. Heat map of electron transfer during excitation from the ground state to the first excited state of probe-b (upper panel) and the corresponding schematic diagram of atomic numbering (lower panel)

图 6. Probe-b 由基态到第一激发态激发过程中的电子转移热图(上图)及其原子序号示意图(下图)

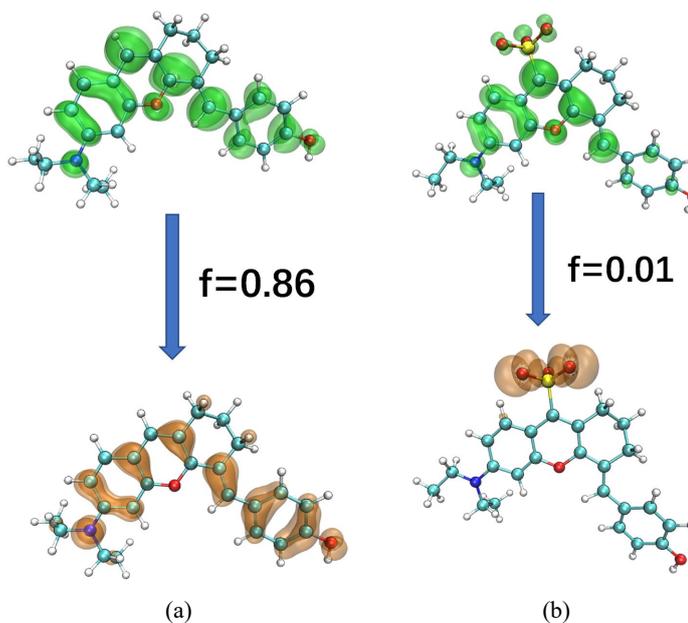


Figure 7. Electron radiative process from the first excited state to the ground state of the fluorescent probes: (a) probe-a, (b) probe-b

图 7. 荧光探针由第一激发态到基态的电子辐射过程 (a) probe-a (b) probe-b

振子强度(f)是衡量荧光探针荧光性能的重要参数, 其值越大, 表明探针的荧光强度越强。计算结果如图 7 表明, probe-a 的振子强度为 0.86, 表现出较强的荧光; probe-b 的振子强度为 0.01, 表现出较弱的荧光。这一结果与态密度分析和电子转移热图分析结果一致, 进一步证实了 probe-a 具有局域激发特性, probe-b 具有电荷转移激发特性。

4. 结论与展望

本研究对象为一种可逆荧光探针(probe-a), 并通过与 SO_3^{2-} 的相互作用可生产 probe-b。研究表明, probe-a 对 SO_3^{2-} 具有高选择性和高灵敏度, 加入 SO_3^{2-} 后荧光强度显著猝灭; probe-b 对 H_2O_2 具有高选择性和高灵敏度, 加入 H_2O_2 后荧光强度得以恢复, 探针具有良好的可逆性。

通过理论计算(态密度分析、ALIE 分析、电子转移热图分析等)揭示了探针的荧光响应机制: probe-a 的 HOMO 与 LUMO 均匀分布于整个分子, 表现出局域激发特性, 产生较强的荧光; probe-b 的 HOMO 与 LUMO 发生空间分离, 分别定位于 SO_3 基团和分子主体部分, 表现出电荷转移激发特性, 导致荧光强度显著减弱; SO_3 基团具有强还原反应活性, 与 H_2O_2 发生氧化还原反应后, 探针分子恢复为 probe-a 的结构, 荧光强度得以恢复。

该研究不仅为设计新型可逆荧光探针提供了新的思路和方法, 还为深入理解荧光响应机制提供了重要的理论依据。然而, 该探针在生物体内的应用仍面临一些挑战, 如生物相容性、细胞穿透性等问题。未来的研究方向可以包括: (1) 对探针的结构进行修饰, 提高其生物相容性和细胞穿透性; (2) 将探针应用于细胞内 SO_3^{2-} 与 H_2O_2 的实时原位检测; (3) 开发基于该探针的生物成像技术, 为疾病的早期诊断提供新的手段。

参考文献

- [1] Yu, Y., Zhang, Q., Guo, Y., Wu, J., Zhao, L., Wang, Z., *et al.* (2025) Ros-Related Nanoparticles for the Management of Alzheimer's Disease: Wielding the Double-Edged Sword. *Chemical Engineering Journal*, **511**, Article ID: 161784. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.161784>
- [2] Xie, J., Dong, R., Zhang, T., Guo, F., Li, H., Chen, X., *et al.* (2024) Natural Dietary ROS Scavenger-Based Nanomaterials for Ros-Related Chronic Disease Prevention and Treatment. *Chemical Engineering Journal*, **490**, Article ID: 151756. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.151756>
- [3] Chauhan, A., Kamal, R., Bhatia, R., Singh, T.G. and Awasthi, A. (2024) From Bench to Bedside: Ros-Responsive Nanocarriers in Cancer Therapy. *AAPS PharmSciTech*, **26**, Article No. 10. <https://doi.org/10.1208/s12249-024-03011-5>
- [4] Roy, B., Shieh, M., Das, E., Lindahl, S., Xu, S., Ni, X., *et al.* (2024) Phototriggered Generation of Reactive Sulfur Species. *Free Radical Biology and Medicine*, **224**, S13. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.10.022>
- [5] Giedroc, D.P., Antelo, G.T., Fakhoury, J.N. and Capdevila, D.A. (2023) Sensing and Regulation of Reactive Sulfur Species (RSS) in Bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, **76**, Article ID: 102358. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102358>
- [6] Fukudome, M., Ishizaki, H., Shimokawa, Y., Mori, T., Uchi-Fukudome, N., Umnajkitikorn, K., *et al.* (2023) Reactive Sulfur Species Produced by Cystathionine γ -Lyase Function in the Establishment of *Mesorhizobium loti*—*Lotus japonicus* Symbiosis. *Microbes and Environments*, **38**, Article ID: ME23021. <https://doi.org/10.1264/jisme2.me23021>
- [7] Fan, K., Wang, W., Xu, X., Yuan, Y., Ren, N., Lee, D., *et al.* (2023) Recent Advances in Biotechnologies for the Treatment of Environmental Pollutants Based on Reactive Sulfur Species. *Antioxidants*, **12**, Article 767. <https://doi.org/10.3390/antiox12030767>
- [8] Yao, X., Li, Y., Guo, Y., Zhong, K., Tang, L. and Yan, X. (2024) An Aie-Based Ratiometric Fluorescent Probe for Reversible Detection of Bisulfite and Hydrogen Peroxide and Its Application in Food Samples and Biological Imaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **446**, Article ID: 115116. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2023.115116>
- [9] Xia, H., Li, H., Zhang, W. and Kong, Y. (2023) Synthesis and Application of Dual-Channel Fluorescent Probes for Selective Recognition of $\text{SO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **378**, Article ID: 133146. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.133146>

- [10] Tian, L., Sun, X., Zhou, L., Zhong, K., Li, S., Yan, X., *et al.* (2023) Reversible Colorimetric and NIR Fluorescent Probe for Sensing SO₂/H₂O₂ in Living Cells and Food Samples. *Food Chemistry*, **407**, Article ID: 135031. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135031>
- [11] Wang, Y., Chen, R., Tian, R., Li, Y., Guo, Z., Fang, Y., *et al.* (2021) A Mitochondria-Targeted Fluorescent Probe for Real-Time Imaging SO₂/H₂O₂. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **262**, Article ID: 120134. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120134>
- [12] Ullah, Z., Roy, S., Gu, J., Ko Soe, S., Jin, J. and Guo, B. (2024) NIR-II Fluorescent Probes for Fluorescence-Imaging-Guided Tumor Surgery. *Biosensors*, **14**, Article 282. <https://doi.org/10.3390/bios14060282>
- [13] Qian, M., Ye, Y., Ren, T., Xiong, B., Yuan, L. and Zhang, X. (2024) Cancer-targeting and Viscosity-Activatable Near-Infrared Fluorescent Probe for Precise Cancer Cell Imaging. *Analytical Chemistry*, **96**, 13447-13454. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c01551>
- [14] Li, C., Wang, X., Zhu, X., Liu, J. and Ye, Y. (2024) A Novel NIR Fluorescent Probe to Image HNO during Ferroptosis. *Analytica Chimica Acta*, **1330**, Article ID: 343265. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343265>
- [15] Deng, C., Wang, Y., Sun, Y. and Lü, C. (2024) A Near-Infrared Fluorescent Probe with Thiadiazole Unit as Key Skeleton for ICT and ESIPT Mechanism and Effective Detection of Cu²⁺. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **318**, Article ID: 124465. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124465>
- [16] Chen, Y., Bao, J., Pan, X., Chen, Q., Yan, J., Yang, G., *et al.* (2024) A Near-Infrared Fluorescent Probe with Large Stokes Shift for Sensitive Detection of Hydrogen Sulfide in Environmental Water, Food Spoilage, and Biological Systems. *The Journal of Physical Chemistry B*, **128**, 5846-5854. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.4c02258>
- [17] Zhang, W., Huo, F., Zhang, Y., Chao, J. and Yin, C. (2019) Mitochondria-Targeted NIR Fluorescent Probe for Reversible Imaging H₂O₂/SO₂ Redox Dynamics *in Vivo*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **297**, Article ID: 126747. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126747>
- [18] Laun, J. and Bredow, T. (2022) BSSE-Corrected Consistent Gaussian Basis Sets of Triple-Zeta Valence with Polarization Quality of the Fifth Period for Solid-State Calculations. *Journal of Computational Chemistry*, **43**, 839-846. <https://doi.org/10.1002/jcc.26839>
- [19] Frisch, G.W.T.M.J., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, J.R.C.M.A., Scalmani, G., Barone, V., *et al.* (2019) Gaussian 16. Revision C.02.
- [20] Lu, T. (2024) A Comprehensive Electron Wavefunction Analysis Toolbox for Chemists, Multiwfn. *The Journal of Chemical Physics*, **161**, Article ID: 082503. <https://doi.org/10.1063/5.0216272>
- [21] Lu, T. and Chen, F. (2011) Multiwfn: A Multifunctional Wavefunction Analyzer. *Journal of Computational Chemistry*, **33**, 580-592. <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>
- [22] Politzer, P., Murray, J.S. and Bulat, F.A. (2010) Average Local Ionization Energy: A Review. *Journal of Molecular Modeling*, **16**, 1731-1742. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0709-5>