

基于CANBD探针的生物硫醇半胱氨酸荧光检测机制研究

庞楚璇¹, 徐康蕊², 刘璐³, 彭永进³, 张博^{3*}

¹锦州医科大学附属第一医院, 辽宁 锦州

²西安科技大学电气与控制工程学院, 陕西 西安

³锦州医科大学智能医学学院, 辽宁 锦州

收稿日期: 2026年3月10日; 录用日期: 2026年4月29日; 发布日期: 2026年5月7日

摘要

为探究探针CANBD对生物硫醇半胱氨酸(Cys)的特异性荧光检测机制, 本研究从电子结构角度出发, 结合密度泛函理论相关分析方法, 通过分子态密度(DOS)分析、电子密度差异表征、原子电子转移贡献热图分析及电子激发过程计算, 系统研究了探针CANBD与Cys反应前后的电子结构变化及光致激发特性。结果表明, 探针CANBD因存在从香豆素(CA)到7-硝基苯并氧杂恶二唑(NBD)的分子内电荷转移(ICT)效应, 基态到第一激发态($S_0 \rightarrow S_1$)的振子强度仅为0.0133, 荧光发射被完全猝灭; 与Cys反应后生成的NBD-Cys产物, 其最高占据分子轨道(HOMO)和最低未占据分子轨道(LUMO)均局域于NBD部分, 发生NBD区域的局域激发(LE), $S_0 \rightarrow S_1$ 振子强度提升至0.6715, 表现出强烈的黄色荧光, 同时反应生成的CA也可发射特征蓝色荧光。本研究从电子转移、轨道贡献、激发特性等方面揭示了CANBD探针实现Cys荧光检测的微观机制, 为生物硫醇荧光探针的分子设计与性能优化提供了理论依据和电子结构层面的参考。

关键词

CANBD探针, 生物硫醇, 半胱氨酸, 荧光检测, 电子结构, 分子内电荷转移, 局域激发

Study on Fluorescence Detection Mechanism of Biological Thiol Cysteine Based on CANBD Probe

Chuxuan Pang¹, Kangrui Xu², Lu Liu³, Yongjin Peng³, Bo Zhang^{3*}

¹The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning

²School of Electrical and Control Engineering, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an Shaanxi

³School of Intelligent Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning

*通讯作者。

文章引用: 庞楚璇, 徐康蕊, 刘璐, 彭永进, 张博. 基于 CANBD 探针的生物硫醇半胱氨酸荧光检测机制研究[J]. 自然科学, 2026, 14(3): 273-281. DOI: 10.12677/ojns.2026.143031

Abstract

To explore the specific fluorescence detection mechanism of probe CANBD for biological thiol cysteine (Cys), this study systematically investigated the electronic structure changes and photoexcitation characteristics of probe CANBD before and after reaction with Cys from the perspective of electronic structure, combined with relevant analysis methods of density functional theory, including molecular density of states (DOS) analysis, electron density difference characterization, heat map analysis of atomic contribution to electron transfer and calculation of electronic excitation processes. The results showed that the probe CANBD had an intramolecular charge transfer (ICT) effect from coumarin (CA) to 7-nitrobenzofurazan (NBD), and the oscillator strength from the ground state to the first excited state ($S_0 \rightarrow S_1$) was only 0.0133, resulting in complete quenching of fluorescence emission. For the NBD-Cys product formed after the reaction with Cys, both the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) were localized in the NBD moiety, and local excitation (LE) occurred in the NBD region. The oscillator strength of $S_0 \rightarrow S_1$ increased to 0.6715, showing intense yellow fluorescence, and the CA formed by the reaction could also emit characteristic blue fluorescence. This study revealed the microscopic mechanism of CANBD probe for Cys fluorescence detection from the aspects of electron transfer, orbital contribution and excitation characteristics, and provided a theoretical basis and electronic structure reference for the molecular design and performance optimization of fluorescent probes for biological thiols.

Keywords

CANBD Probe, Biological Thiols, Cysteine, Fluorescence Detection, Electronic Structure, Intramolecular Charge Transfer (ICT), Local Excitation (LE)

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

生物硫醇是生物体内一类含巯基(-SH)的重要小分子物质,其中半胱氨酸(Cys)作为构成蛋白质的基本氨基酸之一,同时参与生物体内的氧化还原平衡、信号传导、蛋白质折叠等多种生理过程,其体内含量的异常与心血管疾病、神经系统疾病、癌症等多种病症的发生发展密切相关[1]-[3]。因此,实现生物体内Cys的高灵敏度、高特异性快速检测,对疾病的早期诊断、生理机制研究具有重要的科学意义和应用价值。

荧光探针检测技术因具有操作简便、响应快速、时空分辨率高、可原位实时检测等优势,已成为生物硫醇检测的主流技术之一[4][5]。荧光探针的检测性能主要依赖于分子结构的设计,其核心原理是通过探针分子与目标分析物的特异性反应,引发分子电子结构的改变,进而实现荧光信号的“关-开”转换。7-硝基苯并氧杂恶二唑(NBD)类衍生物因具有良好的光物理性质,且其芳环上的硝基易与生物硫醇的巯基发生亲核取代反应,成为生物硫醇荧光探针设计的常用荧光团和识别基团;香豆素(CA)类化合物则因荧光量子产率高、斯托克斯位移大、光稳定性好等特点,常被用作荧光探针的荧光发色团[6]-[9]。

CANBD 作为一种基于 CA 和 NBD 的双基团荧光探针, 可实现对 Cys 的特异性荧光响应, 与 Cys 反应后由无荧光状态转变为发射蓝色和黄色双荧光的状态, 但目前关于该探针实现荧光“关-开”的微观电子结构机制尚未得到系统且深入的阐释[10]。分子的荧光特性与其电子结构及光致激发过程中的电子转移行为密切相关, 分子内电荷转移(ICT)和局域激发(LE)是影响荧光发射效率的关键因素。本研究以 CANBD 探针及与 Cys 反应后的产物 NBD-Cys 为研究对象, 利用态密度(DOS)分析、电子密度差异表征、原子电子转移贡献分析及电子激发过程计算等手段, 从分子轨道贡献、电子转移路径、激发态特性、振子强度等方面, 系统探究 CANBD 探针识别 Cys 的荧光响应机制, 揭示反应前后分子电子结构变化与荧光特性之间的构效关系, 为新型生物硫醇荧光探针的分子设计、性能调控提供理论支撑[11]-[13]。

2. 实验与计算方法

本研究采用密度泛函理论(DFT)和含时密度泛函理论(TD-DFT)为核心的量子化学计算方法, 对 CANBD 探针及 NBD-Cys 产物的电子结构、光致激发过程进行模拟计算。在分子结构优化过程中, 选择合适的泛函和基组, 确保分子基态结构的稳定性; 基于优化后的基态结构, 进行 TD-DFT 计算, 得到分子的电子激发能、振子强度、分子轨道贡献等参数。所有计算采取 PCM 隐式溶剂模型, 溶剂为水。通过态密度(DOS)分析表征分子最高占据分子轨道(HOMO)和最低未占据分子轨道(LUMO)的轨道分布特征, 利用电子密度差异图直观呈现光激发过程中的电子转移方向和区域, 通过原子电子转移贡献热图定量分析各原子在电子转移过程中的贡献度, 系统解析分子光致激发过程中的电子行为特征[14]-[18]。

3. 结果与讨论

3.1. CANBD 探针检测 Cys 的宏观反应与荧光响应特征

探针 CANBD 是由 CA 和 NBD 通过共价键连接形成的双基团分子, 其与生物硫醇 Cys 发生特异性亲核取代反应, 实现分子的裂解, 生成游离的 CA 和 NBD 与 Cys 结合的产物 NBD-Cys, 反应机制如图 1 所示。

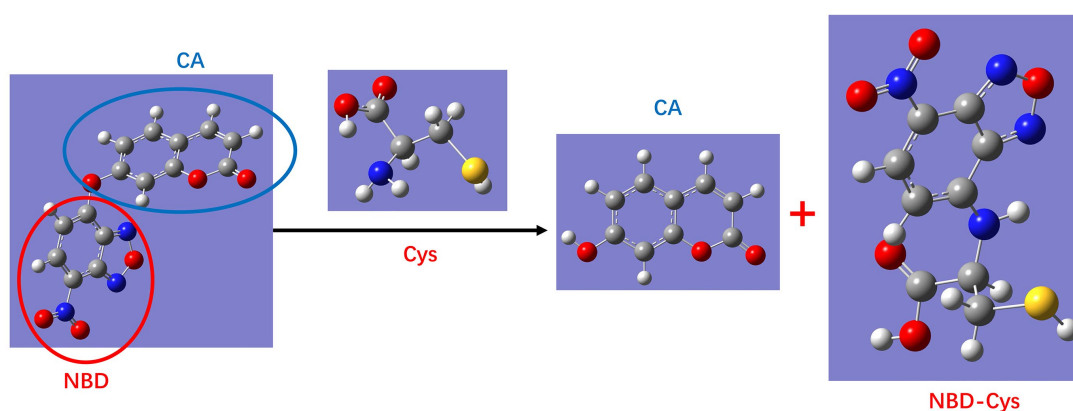


Figure 1. Mechanism diagram of biological thiol Cys detection by probe CANBD

图 1. 探针 CANBD 检测生物硫醇 Cys 机制图

从宏观荧光响应来看, 探针 CANBD 本身无荧光发射, 这是其实现荧光“关”状态的基础; 与 Cys 反应后, 体系出现明显的双荧光发射特征, 其中生成的 CA 分子发射特征蓝色荧光, 而 NBD-Cys 产物发射特征黄色荧光, 通过荧光信号的显著变化实现对 Cys 的特异性检测。这种荧光“关-开”的转换本质上是由反应前后分子电子结构的改变引起的, 光致激发过程中电子转移行为的差异是导致荧光特性变化的

核心微观原因, 因此, 从电子结构角度探究 CANBD 探针与 Cys 反应前后的分子轨道分布、电子转移特征、激发态特性, 是揭示其荧光检测机制的关键。

3.2. 分子轨道分布特征: DOS 图分析

态密度(DOS)图可直观表征分子最高占据分子轨道(HOMO)和最低未占据分子轨道(LUMO)的轨道贡献来源, 是分析分子电子结构的重要手段。本研究分别对探针 CANBD 和产物 NBD-Cys、CA 进行 DOS 图分析, 结果如图 2 和图 3、图 4 所示。

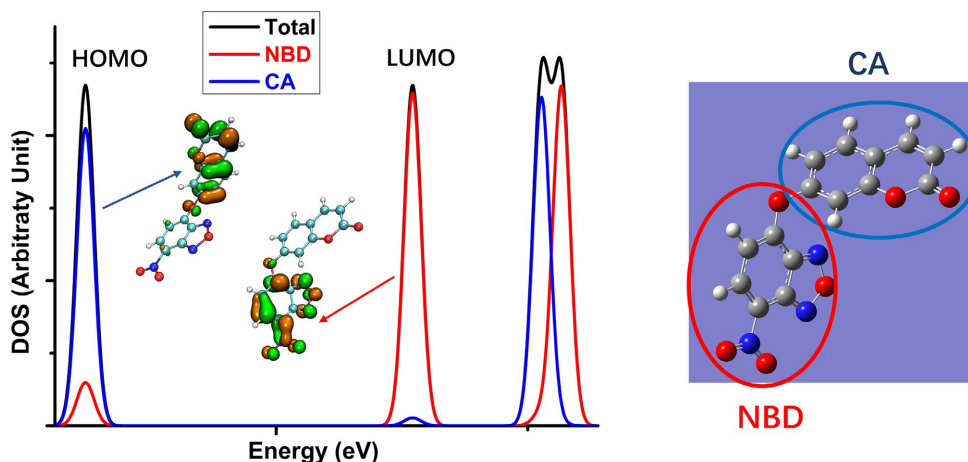


Figure 2. DOS diagram of probe CANBD
图 2. 探针 CANBD 的 DOS 图

探针 CANBD 的 DOS 图显示, 其 HOMO 主要由 CA 部分的原子轨道贡献, 而 LUMO 则主要由 NBD 部分的原子轨道贡献, HOMO 和 LUMO 呈现出明显的分离分布特征。这种轨道分布特点决定了 CANBD 分子在光致激发过程中, 电子将从占据 HOMO 的 CA 部分向占据 LUMO 的 NBD 部分发生转移, 即存在从 CA 到 NBD 的分子内电子转移趋势, 为分子内电荷转移(ICT)效应的发生提供了电子结构基础。

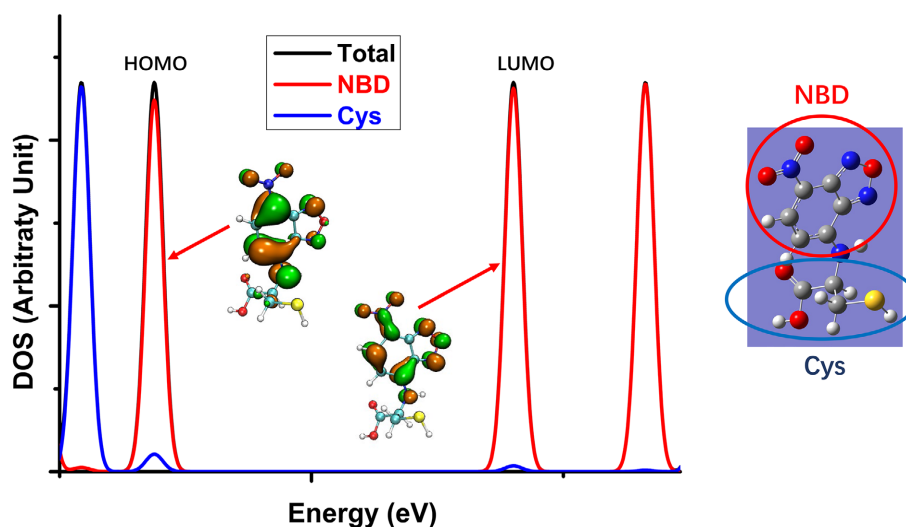


Figure 3. DOS diagram of product NBD-Cys
图 3. 产物 NBD-Cys 的 DOS 图

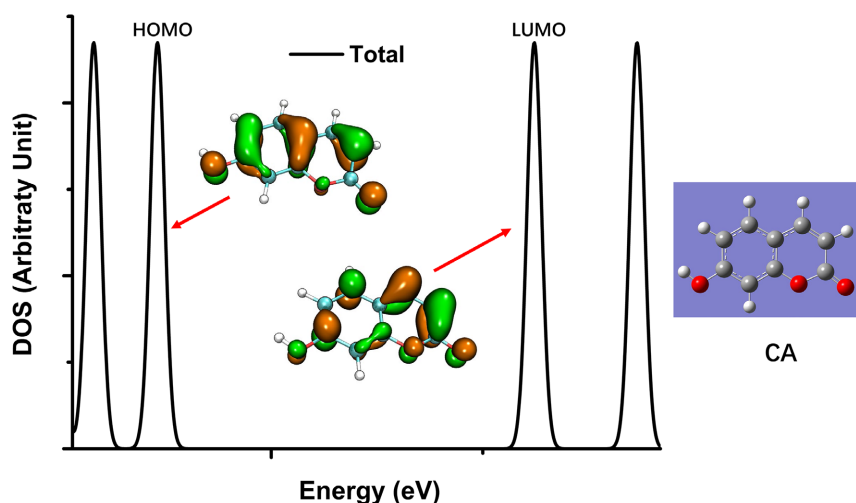


Figure 4. DOS diagram of product CA
图 4. 产物 CA 的 DOS 图

与探针 CANBD 不同, 产物 NBD-Cys 和 CA 的 DOS 图表现出完全不同的轨道分布特征, 产物 NBD-Cys 的 HOMO 和 LUMO 均主要由 NBD 部分的原子轨道贡献, CA 部分因与 NBD 发生共价键断裂而脱离, 不再参与 NBD-Cys 的分子轨道构成。NBD-Cys 的 HOMO 和 LUMO 均局域于 NBD 部分, CA 的 HOMO 和 LUMO 则分布于其整体分子, 二者的轨道分布呈现出高度的局域性, 这种轨道特征使得该分子在光致激发过程中表现出典型的局域激发(LE)特征。

分子轨道的分布特征决定了光激发过程中电子转移的基本趋势, CANBD 探针的 HOMO-CA、LUMO-NBD 分离分布是 ICT 效应发生的前提, 而 NBD-Cys 的 HOMO 和 LUMO 均局域于 NBD 则是 LE 效应的核心电子结构基础, 二者轨道分布的显著差异是其荧光特性不同的根本原因。

3.3. 光激发电子转移特征: 电子密度差异图分析

为直观呈现光致激发过程中的电子转移行为, 本研究通过分子基态与第一激发态的电子密度差异图, 表征探针 CANBD 和产物 NBD-Cys、CA 在 $S_0 \rightarrow S_1$ 激发过程中的电子转移方向、区域和程度, 结果如图 5 所示。其中, 橙色区域代表空穴区域, 即电子激发后出现的电子密度减少区域; 绿色区域代表电子密度增加区域, 即电子激发后电子的转移富集区域, 电子在光激发过程中由橙色空穴区域向绿色电子密度增加区域转移。

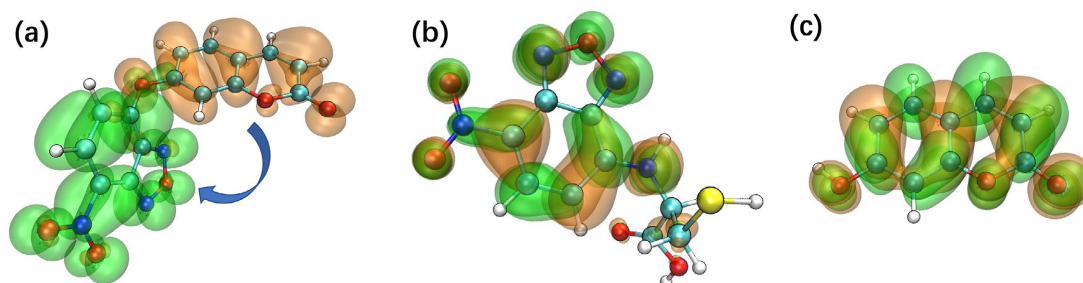


Figure 5. Schematic diagram of electron transfer during molecular excitation: electron density difference diagram between ground state and first excited state. (a) Probe CANBD; (b) Product NBD-Cys; (c) Product CA

图 5. 分子激发过程中电子转移示意图: 基态与第一激发态电子密度差异图。(a) 探针 CANBD; (b) 产物 NBD-Cys; (c) 产物 CA

对于探针 CANBD (图 5(a)), 光激发过程中电子密度减少的空穴区域主要分布在 CA 部分, 而电子密度增加的区域则主要分布在 NBD 部分, 电子从 CA 部分向 NBD 部分发生明显的跨基团转移, 呈现出典型的分子内电荷转移(ICT)特征。这种长距离的分子内电荷转移会导致激发态的非辐射弛豫过程增强, 使得激发态电子难以通过辐射跃迁的方式回到基态, 进而导致荧光发射效率极低, 表现为探针本身无荧光的宏观特征。

对于产物 NBD-Cys (图 5(b)), 光激发过程中的电子密度减少区域和增加区域均集中分布在 NBD 部分, 未出现跨区域的电子转移, 电子仅在 NBD 部分内部发生重新分布, 和产物 CA (图 5(c))一样表现出典型的局域激发(LE)特征。局域激发过程中, 激发态电子的非辐射弛豫过程被显著抑制, 电子更易通过辐射跃迁的方式回到基态, 荧光发射效率大幅提升, 因此 NBD-Cys 表现出强烈的黄色荧光, 实现了荧光“开”的状态。

电子密度差异图的分析结果与 DOS 图的轨道分布特征高度一致, 直观验证了 CANBD 探针的 ICT 效应和 NBD-Cys、CA 产物的 LE 效应, 明确了反应前后光激发过程中电子转移行为的核心差异, 从电子运动的角度解释了二者荧光特性的不同。

3.4. 原子电子转移贡献：热图分析

为定量分析各原子在光致激发电子转移过程中的贡献度, 进一步明确电子转移的具体路径, 本研究绘制了探针 CANBD 和产物 NBD-Cys 在 $S_0 \rightarrow S_1$ 激发过程中各原子对电子转移的贡献热图, 结果如图 6 所示。其中, 横坐标为原子序号, 纵坐标分别代表空穴(Hole)、电子(Electron)和轨道重叠(Overlap)的贡献值, 贡献值的大小反映了该原子在电子转移过程中的参与程度。

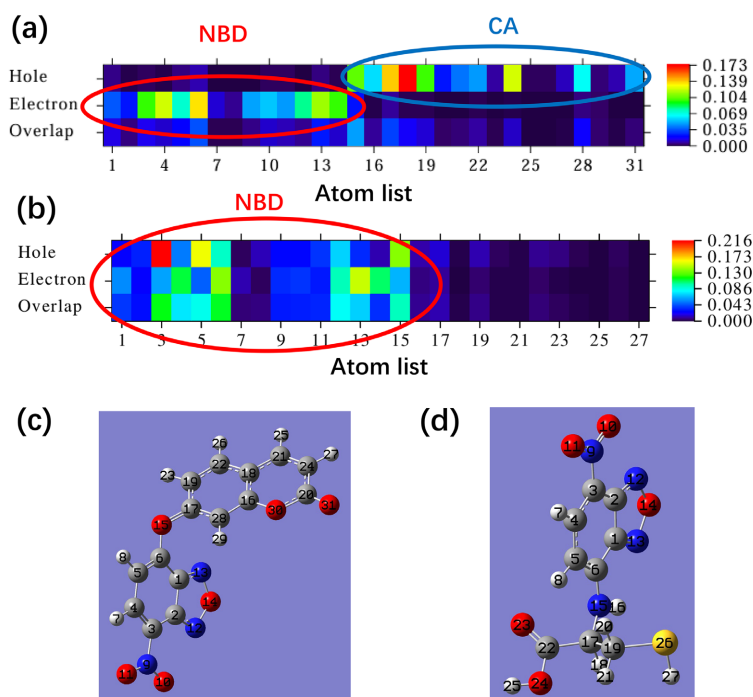


Figure 6. Heat map of atomic contribution to electron transfer during molecular excitation. (a) Probe CANBD; (b) Product NBD-Cys and molecular structure; (c) Probe CANBD; (d) Product NBD-Cys

图 6. 分子激发过程中各原子对电子转移的贡献热图。(a) 探针 CANBD; (b) 产物 NBD-Cys 及分子结构图; (c) 探针 CANBD; (d) 产物 NBD-Cys

探针 CANBD 的原子电子转移贡献热图(图 6(a))显示, 空穴贡献值较高的原子主要为 CA 部分的原子, 而电子贡献值较高的原子则主要为 NBD 部分的原子, CA 和 NBD 部分的原子在空穴和电子贡献上呈现出明显的分离特征, 且二者的轨道重叠贡献值极低。这一结果定量表明, CANBD 在光激发过程中, 电子转移主要发生在 CA 和 NBD 两个不同的基团之间, CA 部分的原子为电子给体, NBD 部分的原子为电子受体, 电子由电子给体向电子受体发生定向转移, 且两个基团之间的轨道重叠程度低, 进一步证实了分子内电荷转移(ICT)的发生, 且这种 ICT 过程为典型的长距离电荷转移, 荧光猝灭效应显著。

产物 NBD-Cys 的原子电子转移贡献热图(图 6(b))显示, 空穴和电子贡献值较高的原子均为 NBD 部分的原子, Cys 部分的原子在电子转移过程中的贡献值极低, 几乎不参与光激发的电子转移过程, 且 NBD 部分原子的轨道重叠贡献值显著高于 CANBD 探针。这一结果定量表明, NBD-Cys 在光激发过程中, 电子转移仅发生在 NBD 部分内部, Cys 仅作为识别基团与 NBD 结合, 不参与分子的光物理过程, NBD 部分的原子同时承担电子给体和电子受体的角色, 发生局域于 NBD 内部的电子转移, 即局域激发(LE), 且较高的轨道重叠程度使得激发态电子的辐射跃迁效率大幅提升, 最终表现为强烈的荧光发射。

原子电子转移贡献热图从定量角度进一步解析了 CANBD 和 NBD-Cys 的电子转移特征, 与 DOS 图、电子密度差异图的分析结果相互印证, 形成了从轨道分布、电子转移直观特征到原子贡献定量分析的完整证据链, 明确了 ICT 和 LE 效应是导致二者荧光特性差异的核心电子过程。

3.5. 电子激发过程的量化特征：激发能与振子强度

为进一步量化表征探针 CANBD 和产物 NBD-Cys、CA 的光致激发特性, 本研究通过含时密度泛函理论(TD-DFT)计算, 得到二者基态到第一激发态($S_0 \rightarrow S_1$)的主要电子激发过程参数, 包括激发能(理论值/实验值)、振子强度、跃迁组成及波函数系数, 结果如表 1 所示。

Table 1. The main electron excitation processes in the probe CANBD and products NBD Cys and CA; ^a H stand for HOMO and L stands for LUMO; ^b Coefficient of the wave function for each excitation was in absolute value

表 1. 探针 CANBD 及产物 NBD-Cys、CA 的主要电子激发过程; ^a H 代表 HOMO, L 代表 LUMO; ^b 各激发的波函数系数为绝对值

Probe/sensing product	Electronic transition	Excitation Energy theoretical/experimental (nm)	Oscillator strength	Composition ^a	CI ^b
CANBD	$S_0 \rightarrow S_1$	303/330	0.0133	H \rightarrow L	0.7841
NBD-Cys	$S_0 \rightarrow S_1$	448/460	0.6715	H \rightarrow L	0.8042
CA	$S_0 \rightarrow S_1$	318/330	0.6526	H \rightarrow L	0.7980

振子强度是表征分子光致激发过程中辐射跃迁概率的重要参数, 振子强度越大, 辐射跃迁概率越高, 荧光发射效率越强; 反之, 振子强度越小, 辐射跃迁概率越低, 荧光发射越弱, 甚至发生荧光猝灭。

从表 1 数据可以看出, 探针 CANBD 的 $S_0 \rightarrow S_1$ 电子跃迁为 HOMO \rightarrow LUMO 跃迁, 理论激发能为 303 nm, 实验激发能为 330 nm, 二者具有良好的一致性; 其振子强度仅为 0.0133, 远低于荧光发射的有效振子强度阈值, 表明 CANBD 在光激发过程中, 辐射跃迁概率极低, 激发态电子主要通过非辐射弛豫过程回到基态, 因此探针本身无荧光发射, 与宏观实验现象一致。同时, CANBD 的 $S_0 \rightarrow S_1$ 跃迁波函数系数为 0.7841, 表明该跃迁为典型的单轨道跃迁, 进一步证实了电子从 CA-HOMO 向 NBD-LUMO 的定向转移特征。

产物 NBD-Cys 的 $S_0 \rightarrow S_1$ 电子跃迁同样为 HOMO \rightarrow LUMO 跃迁, 其理论激发能为 448 nm, 实验激发能为 460 nm, 红移至可见光区, 与其实验中发射黄色荧光的光谱特征相符; 其振子强度达到 0.6715, 相

较于 CANBD 探针提升了约 50 倍, 表明 NBD-Cys 在光激发过程中, 辐射跃迁概率大幅提升, 激发态电子主要通过辐射跃迁的方式回到基态, 因此表现出强烈的黄色荧光发射。NBD-Cys 的 $S_0 \rightarrow S_1$ 跃迁波函数系数为 0.8042, 略高于 CANBD 探针, 表明该局域激发跃迁的轨道特征更显著, 电子转移的局域性更强。

此外, CANBD 探针与 Cys 反应后生成的游离 CA 分子, 其本身具有典型的香豆素类荧光团的光物理性质, 可发生特征的局域激发, 发射蓝色荧光, 与 NBD-Cys 的黄色荧光共同构成双荧光响应, 进一步提升了 CANBD 探针对 Cys 检测的特异性和辨识度。

电子激发过程的量化计算结果, 从激发能、振子强度等关键光物理参数角度, 量化验证了 CANBD 探针的荧光猝灭和 NBD-Cys 的荧光发射特征, 将电子结构特征与光物理性质直接关联, 完整揭示了 CANBD 探针对 Cys 荧光检测的“结构-性质”构效关系。

4. 结论

本研究以 CANBD 探针及与 Cys 反应后的产物 NBD-Cys 为研究对象, 从电子结构角度出发, 结合 DOS 图、电子密度差异图、原子电子转移贡献热图及电子激发过程量化计算, 系统探究了 CANBD 探针实现 Cys 特异性荧光检测的微观机制, 得到以下核心结论:

探针 CANBD 的 HOMO 主要由 CA 部分贡献, LUMO 主要由 NBD 部分贡献, 轨道的分离分布导致光激发过程中发生从 CA 到 NBD 的分子内电荷转移(ICT)效应, 电子的长距离跨基团转移使得激发态非辐射弛豫增强, $S_0 \rightarrow S_1$ 振子强度仅为 0.0133, 荧光发射被完全猝灭, 探针表现为无荧光的“关”状态。

CANBD 与 Cys 反应后生成的 NBD-Cys 产物, 其 HOMO 和 LUMO 均局域于 NBD 部分, 光激发过程中发生 NBD 内部的局域激发(LE), 电子仅在 NBD 区域内重新分布, 非辐射弛豫被显著抑制, $S_0 \rightarrow S_1$ 振子强度提升至 0.6715, 辐射跃迁概率大幅增加, 表现出强烈的黄色荧光; 同时反应生成的游离 CA 也可发射特征蓝色荧光, 实现双荧光“开”状态。

原子电子转移贡献热图定量表明, CANBD 的电子转移由 CA 部分原子作为电子给体、NBD 部分原子作为电子受体完成, 轨道重叠程度低; 而 NBD-Cys 的电子转移仅发生在 NBD 部分原子内部, Cys 不参与光物理过程, 轨道重叠程度显著提升, 从原子层面证实了 ICT 和 LE 效应的电子转移特征。

CANBD 和 NBD-Cys 的电子激发能计算值与实验值具有良好的一致性, NBD-Cys 的激发能红移至可见光区, 与其实验荧光发射光谱特征相符, 振子强度的显著差异是二者荧光特性不同的直接量化体现。

本研究从分子轨道分布、电子转移行为、原子贡献、激发态特性等多个维度, 完整揭示了 CANBD 探针对 Cys 荧光检测的微观电子结构机制, 证实了 ICT \rightarrow LE 的电子激发模式转换是实现荧光“关-开”的核心原因。基于本研究揭示的构效关系与光物理机制, 提出两项具有明确指导意义的分子设计新策略。其一, 在探针分子的氰基丙烯酸(CA)识别单元的芳香环对位引入三氟甲基、氰基等强吸电子基团, 通过调控分子前线轨道能级, 可进一步降低 HOMO 能级并增大分子能隙, 有效抑制分子内电荷转移(ICT)过程, 在维持探针对目标物反应活性的同时, 显著降低非特异性响应带来的背景信号, 提升检测体系的信噪比。其二, 对荧光团与识别单元之间的连接臂进行刚性化修饰, 例如引入环烷基或不饱和双键结构, 通过限制分子内旋转降低非辐射跃迁几率, 有望在增强荧光量子产率的同时, 固定探针分子的优势空间构象, 进一步强化目标物诱导的荧光开关效应, 为构建高灵敏度、高特异性的新型响应型荧光探针提供可落地的分子改造方向。

该研究结果为生物硫醇荧光探针的分子设计提供了重要的理论依据, 在后续探针设计中, 可通过调控荧光团和识别基团的轨道分布、共价键连接方式, 实现 ICT 与 LE 效应的可控转换, 进而优化探针的荧光响应性能, 开发出高灵敏度、高特异性的新型生物硫醇荧光探针。同时, 本研究采用的电子结构分析方法也为其他荧光探针的检测机制研究提供了可借鉴的技术路线。

参考文献

- [1] Wang, X., Zhang, X., Zhao, Y., Wu, X., Yang, G., Zhao, Y., *et al.* (2026) Biomimetic Chiral Recognition of Biothiols by Enantiomeric Nanoclusters in Plasma. *Advanced Materials*, **38**, e14158. <https://doi.org/10.1002/adma.202514158>
- [2] Qin, S., Huang, L., Shu, X., Yang, J., Cheng, S. and Wang, Y. (2025) FeS₂ Nanosheets as Mimetic Peroxidase for Sensitive Colorimetric Detection of Biothiols. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **39**, 1699-1711. <https://doi.org/10.4314/bcse.v39i9.4>
- [3] Ali, M., Zhou, C., Gao, Z., Fan, G., Ren, J., Wang, E., *et al.* (2025) Sensitive Fluorescent Probe for Monitoring and Bioimaging Biothiols in Living Systems. *Dyes and Pigments*, **235**, Article ID: 112650. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2025.112650>
- [4] Pang, X., Qin, S., Ma, H., Luo, Y., Fei, Q., Xu, S., *et al.* (2026) Dual-Function Fluorescent Sensor Enabling Real-Time Tracking of Cellular Viscosity and Biothiols Levels. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **347**, Article ID: 126967. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2025.126967>
- [5] Yu, T., Li, Y., Li, J., Gan, Y., Long, Z., Deng, Y., *et al.* (2025) Multifunctional Fluorescent Probe for Simultaneous Detection of ATP, Cys, Hcy, and GSH: Advancing Insights into Epilepsy and Liver Injury. *Advanced Science*, **12**, Article ID: 2415882. <https://doi.org/10.1002/advs.202415882>
- [6] He, S., Liu, C., Guo, X. and Wang, H. (2026) A Ratiometric NIR Two-Photon Probe for Biothiols Detection in Cellular Autophagy and Liver Injury Models. *Talanta*, **298**, Article ID: 128975. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128975>
- [7] Dou, H., Luo, D., Shi, L., Ma, F., Zhao, Y., Huang, T., *et al.* (2026) SERS Monitoring of Biothiols in Serum Based on Thiol-Alkyne Click Reaction. *Microchimica Acta*, **193**, Article No. 147. <https://doi.org/10.1007/s00604-026-07878-y>
- [8] Xie, M., Yang, T., Chen, M., Yu, L., Wang, T., Wei, H., *et al.* (2025) A Colorimetric and Near-Infrared Fluorescent Probe with Large Stokes Shift for Biothiol Bioimaging. *New Journal of Chemistry*, **49**, 13958-13962. <https://doi.org/10.1039/d5nj01958c>
- [9] Wei, M., Yang, M., Leng, H. and Shu, Y. (2025) A Novel Intelligent Sensing Strategy: Integration of Metal-Doped Carbon Dots Nanozymes and Machine Learning for Rapid Screening of Biothiols in Disease. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **444**, Article ID: 138304. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2025.138304>
- [10] Zhai, L., Shi, Z., Tu, Y. and Pu, S. (2019) A Dual Emission Fluorescent Probe Enables Simultaneous Detection and Discrimination of Cys/Hcy and GSH and Its Application in Cell Imaging. *Dyes and Pigments*, **165**, 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.02.010>
- [11] Yang, T., Zuo, Y., Zhang, Y., Gou, Z. and Lin, W. (2019) Novel Polysiloxane-Based Rhodamine B Fluorescent Probe for Selectively Detection of Al³⁺ and Its Application in Living-Cell and Zebrafish Imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **216**, 207-213. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.01.093>
- [12] Wei, C., Zhang, P. and Li, X. (2019) Progress in Fluorescent Probes for Carbon Monoxide Detecting. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, **39**, 3375-3383. <https://doi.org/10.6023/cjoc201906029>
- [13] Chen, T., Chen, Z., Liu, R. and Zheng, S. (2019) A NIR Fluorescent Probe for Detection of Viscosity and Lysosome Imaging in Live Cells. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **17**, 6398-6403. <https://doi.org/10.1039/c9ob01222b>
- [14] 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>
- [15] Lu, T. and Chen, F. (2012) Multiwfn: A Multifunctional Wavefunction Analyzer. *Journal of Computational Chemistry*, **33**, 580-592. <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>
- [16] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, **14**, 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- [17] 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>
- [18] Frischa, M.J. (2019) Gaussian 16, Revision C.02.