



权重依赖荧光寿命成像检测 甘油-水混合物黏度*

罗腾¹⁾ 赵谊华¹⁾ 陆原^{2)**} 严伟^{1)**} 屈军乐¹⁾

¹⁾ 深圳大学物理与光电工程学院, 深圳市光子学与生物光子学重点实验室, 光电子器件与系统教育部广东省重点实验室, 深圳 518060;

²⁾ 深圳大学第六附属医院/华中科技大学协和深圳医院, 深圳 518060)

摘要 目的 基于荧光寿命成像技术, 提出一种黏度检测的新方法, 并评估不同权重荧光寿命在区分甘油-水混合物黏度的能力, 从而提供对黏度区分的准确度和可靠性。**方法** 采用电子学中的权重依赖原理, 分别引入了振幅加权平均荧光寿命(τ_m)和强度加权平均荧光寿命(τ_i)。通过 τ_m 和 τ_i 检测甘油-水混合物黏度变化。振幅加权平均荧光寿命反映了荧光信号振幅与时间的关系, 而强度加权平均荧光寿命则关注荧光信号强度的时变特性。**结果** τ_m 和 τ_i 两种结果相互佐证, 这不仅提高了对甘油-水混合物黏度变化的可靠性, 同时也揭示了 τ_m 和 τ_i 在检测过程中的独特作用。尽管 τ_m 在捕捉荧光信号振幅变化方面发挥了关键作用, 然而, τ_i 在考虑荧光信号强度的时变特性时表现出更高的黏度检测准确度。特别值得注意的是, 由于 τ_i 更为敏感, 微环境黏度检测可以直接利用 τ_i 进行分析。这为实时、高灵敏度的微流体黏度监测提供了更为便捷的途径。通过对 τ_m 和 τ_i 的综合利用, 不仅能够更全面、准确地了解甘油-水混合物的黏度信息, 而且可以根据具体需求选择更为适用的参数进行深入分析。**结论** 振幅加权和强度加权的结合可以在不同条件下更为灵敏地识别黏度的微小变化。这种方法的创新之处在于其对多参数的同时关注, 提高了对黏度变化的敏感性和可分辨性。因此, 这种权重依赖的荧光寿命成像技术不仅为甘油-水混合物的黏度探测提供了一种全新的方法, 同时也为微流体、流变学以及新型功能材料研究等领域提供了有力的分析手段。

关键词 荧光寿命, 黏度, 权重, 甘油

中图分类号 Q631, O439, TN911.74

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0407

黏度是衡量一种浓稠流体的流动性和扩散性的主要因素, 同时是流体扩散速率的主要参考指标。对于浓稠流体, 其黏度较高, 导致了较大的内部阻力, 从而使得流体的流动变得缓慢。相反, 低黏度的流体在外力作用下更容易流动。这使得黏度成为工程、科学和医学领域中的关键参数, 对于设计流体系统、理解生物体内液体流动以及制定化学反应条件等方面都具有重要意义^[1]。生物柴油的生产通常会产生副产物甘油, 该副产物通常通过水冲洗去除。残留的甘油可能会导致燃油过滤器堵塞, 从而损害发动机。测量甘油-水混合溶液的黏度是在流体力学、化学工程和实验室研究中常见的任务, 可反映生物柴油生产中副产物甘油的残留量^[2]。选择合适的方法应考虑混合溶液的黏度范围、样品量、实验条件和精度要求。通常, 旋转黏

度计^[3]和套管黏度计^[4]是常见的选择, 可提供相对较高的精度, 适用于不同黏度范围的液体。但在特定情况下, 其他方法可能更为合适。测量甘油-水混合液黏度时, 染料法是一种非常有用的方法, 尤其适用于低黏度液体^[5-6]。这种方法涉及向混合液中添加染料, 并使用染料在流动过程中的扩散来测量黏度。优点是简单且经济, 适用于低黏度液体, 需要的样品量较少; 缺点是对于高黏度液体不太适用, 需要精确的染料扩散系数。荧光寿命法是

* 深圳市基础研究项目 (JCYJ20190808111418696), 国家自然科学基金 (61975127, 62375180, 62335008) 和深圳大学医工交叉研究基金 (2023YG010) 资助。

** 通讯联系人。

陆原 Tel: 0755-26553111, E-mail: chfsums@163.com

严伟 Tel: 0755-26903761, E-mail: weiyan@szu.edu.cn

收稿日期: 2023-10-25, 接受日期: 2023-12-11

一种用于测量液体黏度的敏感且非侵入性的方法^[7-8]。这种方法通常涉及在混合液中添加荧光标记物，然后通过观察标记物的荧光寿命来测量黏度。优点是非侵入性，不需要接触混合液，高灵敏度，对黏度的变化非常敏感，适用黏度范围广；缺点是适当的荧光标记物和荧光测量设备，需要建立标定曲线以将荧光寿命转化为黏度值。许多荧光染料对黏度非常敏感，并且已被广泛用于测量液体的黏度。这些染料的荧光寿命通常会随黏度的变化而改变。包括：苯基花菁染料^[9-11]、吡啶染料^[12-13]、荧光蛋白^[14-15]等。

振幅加权平均荧光寿命 (amplitude-weighted average fluorescence lifetime, τ_m) 是根据荧光光谱的振幅 (即信号强度) 对不同寿命分量进行加权平均得出的。信号较强的寿命分量对 τ_m 的贡献更大，振幅高的分量在总体平均值中具有更高的权重。 τ_m 反映的是荧光信号中信号强度最大的寿命分量的平均寿命，用于强调光谱中具有最大信号强度的寿命成分，可以帮助确定主导荧光信号的寿命成分。强度加权平均荧光寿命 (intensity-weighted average fluorescence lifetime, τ_i) 是根据荧光光谱中不同寿命分量的光强度 (光强) 对其进行加权平均得出的。光强较大的寿命分量对 τ_i 的贡献更大，在总体平均值中具有更高的权重。 τ_i 反映的是光谱中光强度最大的寿命分量的平均寿命，突出了在光谱中具有最大光强的寿命成分。总之， τ_m 和 τ_i 都是用于表征复杂的荧光光谱中不同寿命分量的参数，考虑振幅和光强权重的影响。它们有助于更好地理解荧光样品中不同寿命分量的贡献，以及这些成分在光谱中的重要性。选择使用哪个参数通常取决于研究的具体需求和关注的荧光特性^[16-18]。

早期研究发现， τ_i 的准确度约为 1%，对数据采集参数或拟合模型质量的依赖性很小^[19]。因此，可视为荧光衰减数据的主要固有特征。相比之下， τ_m 不稳定，对拟合模型的依赖性强。对于探测到的光子数量较少的数据，如果没有一些先验信息，可能无法正确识别拟合模型中的指数个数，这可能导致对 τ_m 严重的错误确定。因此，应特别小心地考虑数据质量，以及所使用拟合模型与 τ_m 的关系。早期研究揭示了荧光衰减的主要固有特征是 τ_i 。这个值也可以通过直接从直方图中进行非常简单的无模型计算来高精度地恢复，而不需要耗时的寻找最佳拟合模型的反卷积过程，而且可以轻松自动化。简而言之， τ_i 是非常稳健的特征，与振幅加权特征相

反，它的值取决于数据质量，尤其是所使用的拟合模型。

本工作的研究思路如图文摘要所示：对于 30%、40% 和 50% 体积比 (v/v) 的甘油，其相应的伊红光谱重叠严重，伊红荧光光谱不能显著区分体积比为 30%、40% 和 50% 的甘油。然而将谱域转换为时域，伊红的 τ_m 直方图则能区分 40% 和 50% 体积比的甘油，但伊红的 τ_m 仍不能区分 30% 和 40% 体积比的甘油。随后将 τ_m 拉伸转换为 τ_i ，利用伊红的 τ_i 直方图可区分 30%、40% 和 50% 体积比的甘油。将不同的荧光寿命赋予不同的伪彩色，可利用荧光寿命成像实现计算机辅助的基于寿命的比色黏度测定，借助 τ_i 伪彩图分辨伊红在 30%、40% 和 50% 体积比甘油中的差异。 τ_m 和 τ_i 两种结果相互佐证，这不仅提高了对甘油-水混合物黏度变化的可靠性，同时也揭示了 τ_m 和 τ_i 在检测过程中的独特作用。

1 材料与方法

1.1 材料

甘油购于阿拉丁试剂有限公司 (中国, 上海), 未经进一步纯化即可使用。伊红 (KGA224, 细胞质对比剂) 购于南京基因生物技术有限公司 (中国, 南京)。使用去离子水 (Millipore 18.2 M Ω ·cm⁻¹) 制备伊红原液 (100 g/L)。将甘油和水根据不同质量比的形式配置成 0 : 100、10 : 90、20 : 80、30 : 70、40 : 60、50 : 50、60 : 40、70 : 30、80 : 20、85 : 15、90 : 10 的体系溶剂备用。将探针加入到上述溶剂中配置成的待测液, 将待测液摇晃均匀, 测试荧光发射光谱, 进行荧光寿命成像。

1.2 伊红溶液表征

使用 Horiba 荧光光谱仪 (Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3) 分析荧光光谱, 该仪器配备了一个 450 W 的氙灯作为激发源, 使用了一个 iHR320 单色器, 其探测器为带有液氮冷却的 R5509-72 PMT。激发波长为 495 nm, 以步进宽度 1 nm 在 510~700 nm 范围扫描发射光谱, 积分时间为 0.1 s。

1.3 荧光寿命成像系统

荧光寿命成像系统基于单光子激发和时间相关单光子计数 (time-correlated single photon counting, TCSPC)。系统基于一个倒置显微镜 (ECLIPSE TE2000-E, Nikon, Tokyo, Japan), 配备有 Plan APO 20x/NA0.75 空气物镜。激发光由皮秒超连续 (400~650 nm) 激光器 (SC400-4, Fianium,

Southampton, UK) 产生。激发波长为495 nm。使用 DCS-120 扫描仪 (Becker and Hickl, Berlin, Germany) 进行共焦扫描。物镜收集透过 520~580 nm 带通滤波片 (Chroma, USA) 的荧光, 该荧光随后被光电倍增管 (PMT, R10467U-40, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) 检测, 并连接至 TCSPC 模块 (Becker and Hickl, Berlin, Germany) 进行荧光寿命成像。

1.4 荧光寿命分析

具有时间分辨率的原始光子计数数据使用 SPC Image (Becker and Hickl, Berlin, Germany) 进行处理。至少收集 1 200 个光子下构建荧光寿命图像。每个图像 (256×256 像素) 中每个像素的平均寿命通过双指数拟合计算, 表达式为:

$$I(t)/I(0) = a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (1)$$

其中, a_1 和 a_2 代表比例 ($a_1 + a_2 = 1$), τ_1 和 τ_2 分别代表短寿命和长寿命组分。因此, 根据以下方程计算了幅度加权平均寿命 (τ_m) 和强度加权平均寿命 (τ_i):

$$\tau_m = a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2 \quad (2)$$

$$\tau_i = (a_1 \tau_1^2 + a_2 \tau_2^2) / (a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2) \quad (3)$$

对于每张 256×256 像素的图像, 为每个像素的值分配特定颜色, 生成伪彩色图像。

1.5 微流控芯片制备

聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 微流控通道是使用传统的软印刷工艺和随后的氧等离子体键合法制备。芯片包括一个流体通道, 一个 PDMS 薄膜和一

个压力控制通道 (微阀)。当芯片的微阀打开时, 染料溶液被注入到较低的流体通道中, 然后在压力下关闭微阀, 限制流体通道中的染料溶液, 并测量荧光寿命。

2 结果与讨论

2.1 共焦皿中权重依赖荧光寿命溶液黏度检测

图 1 为荧光寿命成像系统以及微流控芯片的结构示意图。系统具体参数已在材料与方法进行说明。有关检测荧光强度的黏度探针设计方法, 主要有两种。一种是基于光诱导分子内电荷转移的方法^[20], 然而, 通过这一机理设计的探针容易受到溶剂极性的影响。另一种方法涉及设计基于荧光共振能量转移的分子转子^[21], 该方法存在一个问题, 即需要确保作为能量供体的发射光谱与能量受体的吸收光谱具有较好的重叠。这些设计上的要求限制了这类探针的广泛设计与应用。伊红通常用于荧光显微镜成像和荧光标记实验。尽管伊红染料通常不是用于直接测量溶液黏度的首选方法, 但在某些情况下可用于检测和研究溶剂中的溶液黏度测量。将伊红溶解在不同黏度的溶剂中, 伊红分子大小和形状受到周围溶液的黏度影响, 比较伊红吸收或荧光光谱的特征可间接评估溶液黏度变化。本研究将伊红水原液 (100 mg/L) 加入不同体积比的水与甘油混合液中, 伊红荧光光谱随甘油体积比的增加发生红移 (图 2a)。插图为 CIE 1931 色度图。不同色度 CIE 坐标对应不同颜色。

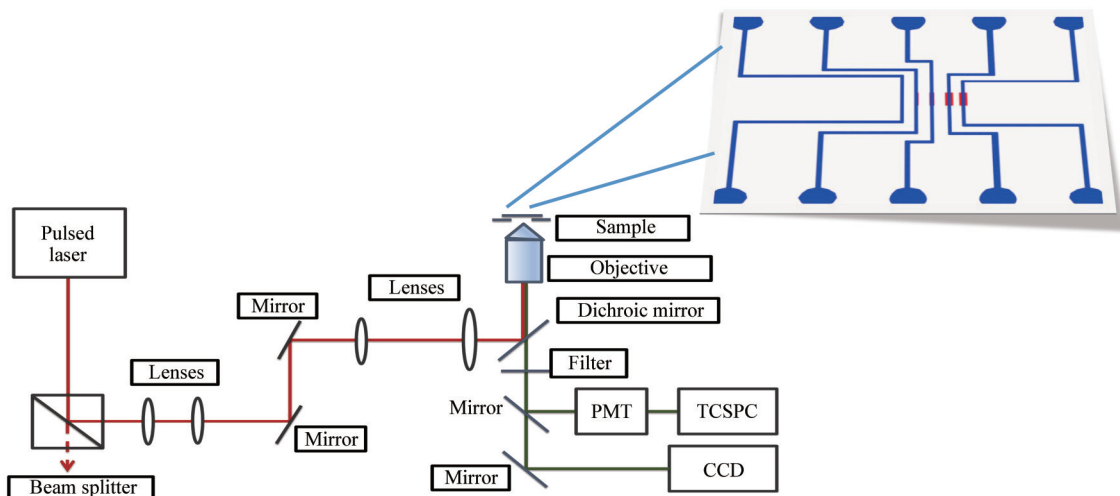


Fig. 1 Fluorescence lifetime imaging system and microfluidic chip structure

Two microchannel ports (channel inlet and outlet) with a diameter of 4 mm and a PDMS thickness of 2 mm were used in this study to facilitate solute injection. The blue dots indicate the inlet and outlet of the microfluidic chip made of PDMS, while the red color represents straight channels of different diameters.

为保持测试环境的一致性，依旧使用测试稳态发射光谱的样品进行荧光寿命测试。随着溶液黏度的增加，溶液荧光寿命值也不断上升（图2b），说明伊红的荧光寿命对黏度的响应，可用于黏度检测。将伊红与不同体积比水和甘油二元混合溶液加入共焦皿中，通过荧光寿命成像可分别得到伊红的

荧光强度图（Int）， τ_m 、 τ_i 荧光寿命伪彩图（图2c）。对不同寿命赋予不同的伪彩色（蓝色为1.1 ns，红色为2.0 ns）。荧光寿命成像技术结合了荧光寿命测量和成像技术，能够在空间上对黏度分布进行更详细的研究。伊红与不同体积比水和甘油混合的 τ_m 和 τ_i 对应的直方图如图2d所示。相同体积比甘油中伊

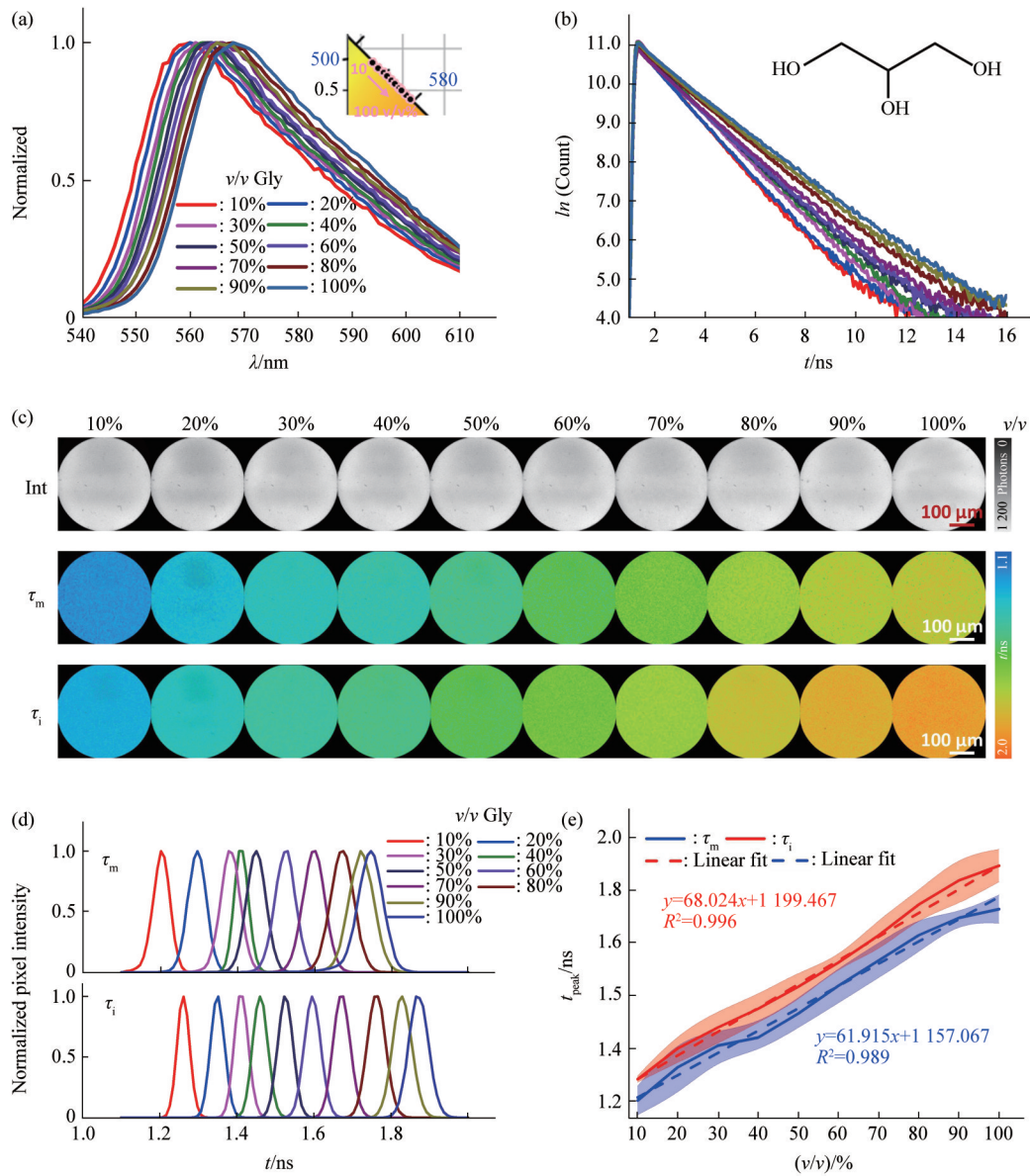


Fig. 2 Using weight-dependent fluorescence lifetime to distinguish binary mixtures of glycerol and water with different volume ratios

(a) Fluorescence spectra of eosin in binary mixtures of glycerol and water with different volume ratios. (b) Fluorescence decay curves of eosin in binary mixtures of glycerol and water with different volume ratios. (c) Eosin fluorescence intensity images (Int), lifetime pseudo-color maps corresponding to the amplitude-weighted mean lifetime (τ_m) and intensity-weighted mean lifetime (τ_i). (d) Histograms of τ_m and τ_i for eosin in binary mixtures of glycerol and water with different volume ratios. (e) Variations in peak values (t_{peak}) of the τ_m and τ_i histograms of eosin with changes in the volume ratio of glycerol.

红的 τ_i 直方图宽度相对其 τ_m 变窄, 且荧光寿命增大, τ_i 直方图具有更好的黏度分辨。图2c所示, 在各体积比甘油中, 伊红的 τ_i 对应寿命伪彩图之间的差异较 τ_m 的更为明显。

相同条件下重复测量5次, 将各溶液寿命值与黏度值对应关系作图(图2e), 计算伊红 τ_m 和 τ_i 直方图峰值随甘油体积比的变化情况, 线性相关分别为 $y=61.915x+1157.067$ ($R^2=0.989$) 和 $y=68.024x+1199.467$ ($R^2=0.996$)。结果令人满意, 线性范围使得利用伊红荧光寿命对甘油黏度的有效定量测量成为可能。不同的伊红荧光寿命对应给定的不同体积比甘油-水混合溶液。建立不同体积比甘油-水混合溶液黏度标定曲线以将荧光寿命转化为黏度值, 可与常用的黏度计测得的数值可保持一致。寿命与黏度之间的函数关系式使得在对未知微环境黏度检测时, 寿命图中的各像素点寿命值都可在函数关系式中对应到相应的黏度值, 即实现微环境黏度的检测。有研究报道基于分子转子的黏度探针通过荧光寿命成像测试细胞内微环境的黏度^[22]。伊红非分子转子黏度探针并非首选的黏度检测染料。本研究特意选择伊红进行黏度检测, 旨在突显权重依赖荧光寿命成像技术在黏度检测方面的优势。

检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantification, LOQ)是用于描述分析方法的灵敏度和可靠性的两个关键性能指标。基于 $3\sigma/s$ 计算得出, 基于 τ_m 和 τ_i 的甘油体积比的LOD值分别为1.83%和0.56% (σ 为溶液空白信号的标准偏差, s 为寿命直方图寿命峰值与甘油体积比之间的线性相关斜率)。从曲线上确定了该方法的LOQ值($10\sigma/s$)分别为6.1%和1.87%。LOD值与LOQ值的比值(LOD/LOQ), 通常用来评估分析方法的灵敏度和可靠性。基于 τ_m 的LOD/LOQ值是基于 τ_i 的LOD/LOQ值的近3倍。LOD与LOQ的比值较小, 表示基于 τ_i 的黏度检测在低浓度下仍能提供较高的灵敏度, 较为可靠的定量分析。该结论与早期 τ_m 和 τ_i 研究结果一致。 τ_i 荧光寿命测量更加灵敏, 能够在更低的浓度和更高的黏度范围内进行测量。这使得对不同样品的黏度进行更广泛的研究成为可能。

2.2 不同微通道中权重依赖荧光寿命溶液黏度检测

荧光寿命测量在微流体学研究中得到广泛应用, 用于监测微流体通道中的黏度变化^[23-27]。这对于微流体生物学和生物传感器的研究非常重要。为验证权重依赖荧光寿命是否可准确区分不同体积比的甘油, 将伊红在不同体积比甘油和水的二元混合溶液分别注入到直径为50、100、150、200和250 μm 的微流控芯片内(图3a)。选取20倍物镜, 每次对注入了不同体积比甘油的3个不同直径的微流控芯片同时进行荧光寿命成像, 由上至下分别为伊红荧光强度图(Int), τ_m 和 τ_i 荧光寿命伪彩图(图3b)。对不同寿命赋予不同的伪彩色(蓝色为1.1 ns, 红色为1.8 ns), 伊红在不同体积比甘油和水的二元混合溶液的 τ_i 寿命伪彩图差异较 τ_m 寿命伪彩图更为明显, 由上至下分别为 τ_m 、 τ_i 伪彩图对应的直方图(图3c)。

通过三顶点高斯拟合发现, τ_i 直方图相对于 τ_m 直方图更易拟合出伊红在3个不同体积比甘油中对应的可区分的寿命峰值(白色箭头), 并且峰宽变窄, 峰与峰之间的间距变大、重叠变少(白线)。分别将伊红在10%、20%和30%体积比甘油和水的二元混合溶液注入到直径为50、100和150 μm 的微流控芯片内, 而将伊红在30%、40%和50%体积比甘油和水的二元混合溶液注入到直径为150、200和250 μm 的微流控芯片内。如图3c, 直径为50、100和150 μm 的微流控芯片内与直径为150、200和250 μm 的微流控芯片内伊红在30%体积比甘油的 τ_m 与 τ_i 峰值相同, 由此可知, 不同微流控芯片以及不同批次寿命测量时, 伊红在相同体积比甘油的寿命是可重复的。另外, 利用伊红的 τ_i 直方图比 τ_m 直方图更易区分30%、40%、50%或60%、70%、80%体积比的甘油。由此可知, τ_i 更为敏感, 微环境黏度检测可以直接利用 τ_i 进行分析。这为实时、高灵敏度的微流体黏度监测提供了更为便捷的途径。通过对 τ_m 和 τ_i 的综合利用, 不仅能够获得更全面、准确地了解甘油-水混合物的黏度信息, 而且可以根据具体需求选择更为适用的参数进行深入分析。

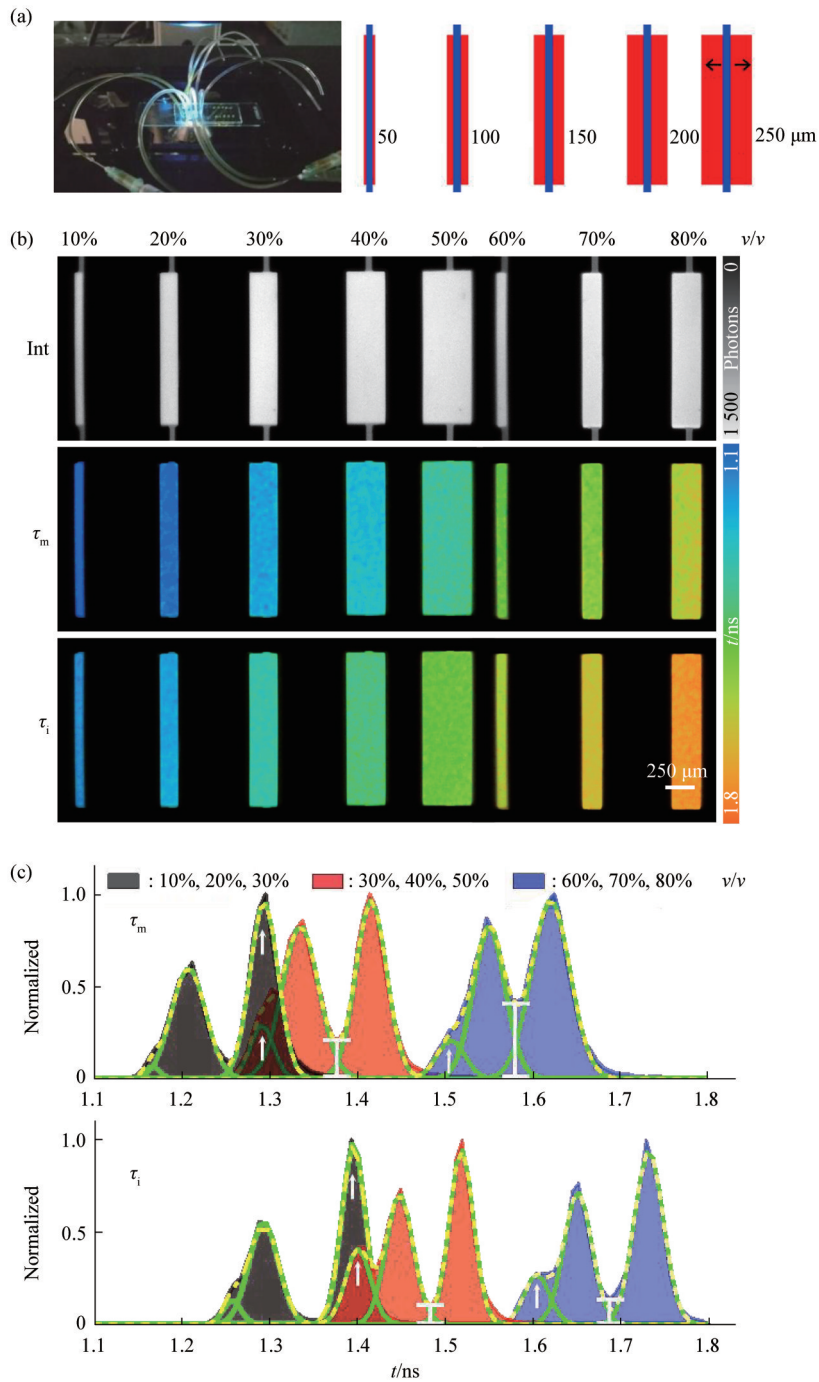


Fig. 3 Using weight-dependent fluorescence lifetime imaging to distinguish glycerol volume ratios within microfluidic chips of different diameters

(a) The experimental microfluidic chip and its schematic diagram displaying various diameters. (b) Glycerol volume ratios within microfluidic chips of varying sizes were discerned through eosin fluorescence intensity images, amplitude-weighted mean lifetime (τ_m), and intensity-weighted mean lifetime (τ_i) pseudo-color maps. (c) Histograms corresponding to the lifetime distributions of τ_m and τ_i , with a three-peak Gaussian fit applied (depicted by yellow dotted lines for the overall fit and green lines for individual peaks).

3 结 论

传统的黏度荧光寿命测量通常尝试使用不同类

型的荧光标记物来测量黏度，着重荧光探针本身的影响。伊红染料是一种有机染料，通常用于荧光显微镜成像和荧光标记实验。尽管伊红染料通常不是

用于直接测量溶液的黏度的标准方法, 但伊红的分子大小和形状可以受到周围溶液的黏度影响。伊红非分子转子黏度探针并非首选的黏度检测染料。本文借助伊红进行黏度检测, 旨在突显权重依赖荧光寿命成像技术在黏度检测方面的优势, 着重比较权重依赖荧光寿命成像中 τ_m 与 τ_i 对甘油体积比变化的响应。甘油溶液浓度增大, 黏度增大, 伊红荧光寿命值也相应增大。黏度与荧光寿命之间的关系可通过荧光寿命的变化来间接测量。溶液的黏度通常会影响分子的运动速度, 进而影响荧光分子的寿命。高黏度环境下, 分子的自由运动受限, 导致荧光分子的寿命增加。这种现象被广泛应用于黏度测量领域, 尤其在生物学和化学领域的研究中。通过测量荧光分子在不同黏度条件下的寿命变化, 可以推断出溶液的黏度水平。实验表明, τ_i 黏度检测具有独特的优势, 有望在黏度的变化检测中发挥重要作用。振幅加权和强度加权的结合可以在不同条件下更为灵敏地识别黏度的微小变化。这种方法的创新之处在于其对多参数的同时关注, 提高了对黏度变化的敏感性和可分辨性。因此, 这种权重依赖的荧光寿命成像技术不仅为甘油-水混合物的黏度探测提供了一种全新的方法, 同时也为微流体、流变学以及新型功能材料研究等领域提供了有力的分析手段。

参 考 文 献

- [1] Kaliviotis E, Yianneskis M. On the effect of dynamic flow conditions on blood microstructure investigated with optical shearing microscopy and rheometry. *Proc Inst Mech Eng H*, 2007, **221**(8):887897
- [2] Silva S G, Rocha F R P. A flow injection procedure based on solenoid micro-pumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel. *Talanta*, 2010, **83**(2): 559-564
- [3] Barber E M, Muenger J R, Villforth Jr F J. High rate of shear rotational viscometer. *Anal Chem*, 1955, **27**(3): 425-429
- [4] Korosi A, Fabuss B M. Viscosity of liquid water from 25 to 150 degree measurements in pressurized glass capillary viscometer. *Anal Chem*, 1968, **40**(1): 157-162
- [5] Peng X, Yang Z, Wang J, *et al.* Fluorescence ratiometry and fluorescence lifetime imaging: using a single molecular sensor for dual mode imaging of cellular viscosity. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(17): 6626-6635
- [6] Yang X, Zhang D, Ye Y, *et al.* Recent advances in multifunctional fluorescent probes for viscosity and analytes. *Coordin Chem Rev*, 2022, **453**: 214336
- [7] Kuimova M K, Yahioglu G, Levitt J A, *et al.* Molecular rotor measures viscosity of live cells *via* fluorescence lifetime imaging. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(21): 6672-6673
- [8] Yan W, Peng X, Qi J, *et al.* Dynamic fluorescence lifetime imaging based on acousto-optic deflectors. *J Biomed Opt*, 2014, **19**(11): 116004
- [9] Moffitt M, Farinha J P S, Winnik M A, *et al.* Steady-state and dynamic fluorescence measurements of a perylene-labeled triblock copolymer: evidence for ground-state dye aggregate formation. *Macromolecules*, 1999, **32**(15): 4895-4904
- [10] Margineanu A, Hotta J, Van der Auweraer M, *et al.* Visualization of membrane rafts using a perylene monoimide derivative and fluorescence lifetime imaging. *Biophys J*, 2007, **93**(8): 2877-2891
- [11] Christensen R L, Drake R C, Phillips D. Time-resolved fluorescence anisotropy of perylene. *J Phys Chem*, 1986, **90**(22): 5960-5967
- [12] Yang Z, He Y, Lee J H, *et al.* A self-calibrating bipartite viscosity sensor for mitochondria. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(24): 9181-9185
- [13] Zhao Q, Yin C, Kang J, *et al.* A viscosity sensitive azide-pyridine BODIPY-based fluorescent dye for imaging of hydrogen sulfide in living cells. *Dyes Pigm*, 2018, **159**: 166-172
- [14] Joron K, Viegas J O, Haas-Neill L, *et al.* Fluorescent protein lifetimes report densities and phases of nuclear condensates during embryonic stem-cell differentiation. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 4885
- [15] Kummer A D, Kompa C, Niwa H, *et al.* Viscosity-dependent fluorescence decay of the GFP chromophore in solution due to fast internal conversion. *J Phys Chem B*, 2002, **106**(30): 7554-7559
- [16] Luo T, Zhao Y, Zhou T, *et al.* Nanosecond-order long-short fluorescence lifetime switchable encryption with enlarged coding capacity. *Nanophotonics*, 2021, **10**(7): 1889-1899
- [17] Luo T, Zhou T, *et al.* Lifetime division multiplexing by multilevel encryption algorithm. *ACS Nano*, 2021, **15**(4): 6257-6265
- [18] Suhling K, Hirvonen L M, Levitt J A, *et al.* Fluorescence lifetime imaging (FLIM): basic concepts and some recent developments. *Medical Photonics*, 2015, **27**: 3-40
- [19] Fišerová E, Kubala M. Mean fluorescence lifetime and its error. *J Lumin*, 2012, **132**(8): 2059-2064
- [20] Haidekker M A, Brady T P, Lichlyter D, *et al.* Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. *Bioorg Chem*, 2005, **33**(6): 415-425
- [21] Fischer D, Theodorakis E A, Haidekker M A. Synthesis and use of an in-solution ratiometric fluorescent viscosity sensor. *Nat Protoc*, 2007, **2**(1): 227-236
- [22] Haidekker M A, Brady T P, Lichlyter D, *et al.* A ratiometric fluorescent viscosity sensor. *J Am Chem Soc*, 2005, **128**(2): 398-399
- [23] Benninger R K P, Hofmann O, McGinty J, *et al.* Time-resolved

- fluorescence imaging of solvent interactions in microfluidic devices. *Opt Express*, 2005, **13**(16): 6275-6285
- [24] Benninger R K P, Koç Y, Hofmann O, *et al.* Quantitative 3D mapping of fluidic temperatures within microchannel networks using fluorescence lifetime imaging. *Anal Chem*, 2006, **78**(7): 2272-2278
- [25] Srisa-Art M, DeMello A J, Edel J B. Fluorescence lifetime imaging of mixing dynamics in continuous-flow microdroplet reactors. *Phys Rev Lett*, 2008, **101**(1): 014502
- [26] Robinson T, Valluri P, Kennedy G, *et al.* Analysis of DNA binding and nucleotide flipping kinetics using two-color two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy. *Anal Chem*, 2014, **86**(21): 10732-10740
- [27] Zhao Y, Liu L, Luo T, *et al.* A platinum-porphine/poly(perfluoroether) film oxygen tension sensor for noninvasive local monitoring of cellular oxygen metabolism using phosphorescence lifetime imaging. *Sensor Actuat B Chem*, 2018, **269**: 88-95

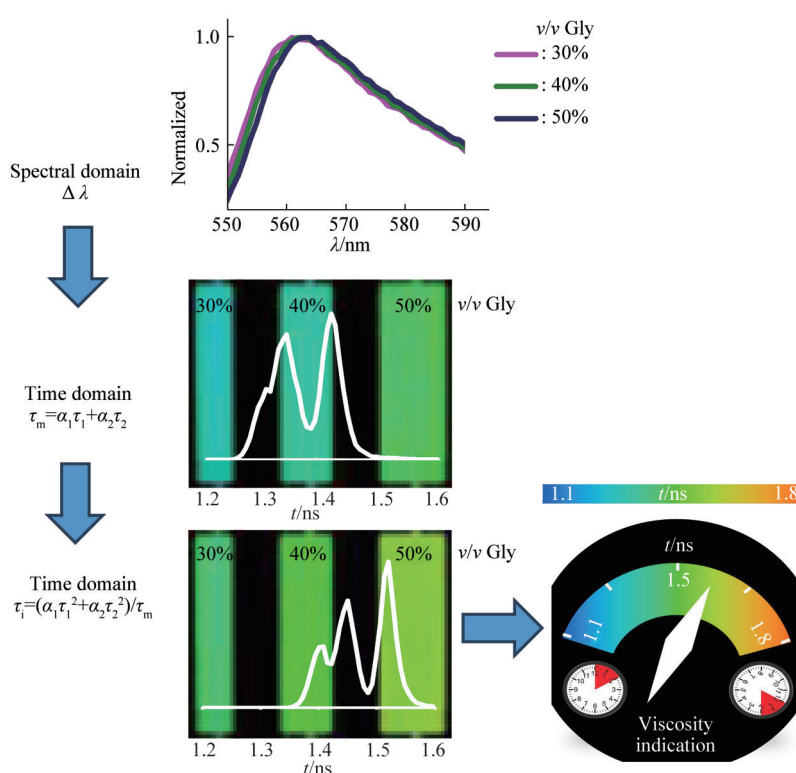
Weight-dependent Fluorescence Lifetime Imaging for Viscosity Detection in Glycerol-water Mixtures*

LUO Teng¹⁾, ZHAO Yi-Hua¹⁾, LU Yuan^{2)**}, YAN Wei^{1)**}, QU Jun-Le¹⁾

¹⁾Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Shenzhen Key Laboratory of Photonics and Biophotonics, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

²⁾The 6th Affiliated Hospital of Shenzhen University, Huazhong University of Science and Technology Union Shenzhen Hospital, Shenzhen 518060, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Based on fluorescence lifetime imaging technology, a novel method for viscosity detection is proposed and the capability of different weighting of fluorescence lifetimes in distinguishing the viscosity of glycerol-water mixtures is evaluated, aiming to enhance the accuracy and reliability of viscosity

* This work was supported by grants from the Basic Research Project of Shenzhen (JCYJ20190808111418696), The National Natural Science Foundation of China (61975127, 62375180, 62335008), and Medical-Engineering Interdisciplinary Research Foundation of Shenzhen University (2023YG010).

** Corresponding author.

LU Yuan. Tel: 86-755-26553111, E-mail: chfsums@163.com

YAN Wei. Tel: 86-755-26903761, E-mail: weiyang@szu.edu.cn

Received: October 25, 2023 Accepted: December 11, 2023

differentiation. **Methods** This approach incorporates the principles of electronic weighting, introducing both amplitude-weighted average fluorescence lifetime (τ_m) and intensity-weighted average fluorescence lifetime (τ_i). Viscosity changes in glycerol-water mixtures are detected through τ_m and τ_i . τ_m Reflects the relationship between fluorescence signal amplitude and time, while τ_i focuses on the time-varying characteristics of fluorescence signal intensity. **Results** The results of both τ_m and τ_i mutually corroborate each other, not only enhancing the reliability in detecting viscosity changes in glycerol-water mixtures but also revealing their unique roles in the detection process. Although τ_m plays a crucial role in capturing changes in fluorescence signal amplitude, τ_i exhibits higher accuracy in viscosity detection when considering the time-varying characteristics of fluorescence signal intensity. It is particularly noteworthy that, due to τ_i 's greater sensitivity, microenvironment viscosity detection can be directly analyzed using τ_i . This provides a more convenient approach for real-time, highly sensitive microfluidic viscosity monitoring. Therefore, through the comprehensive utilization of τ_m and τ_i , a more thorough and accurate understanding of the viscosity information in glycerol-water mixtures can be obtained, and specific parameters can be selected for in-depth analysis based on specific needs. **Conclusion** The combination of amplitude weighting and intensity weighting allows for a more sensitive identification of subtle changes in viscosity under different conditions. The innovation of this method lies in its simultaneous consideration of multiple parameters, enhancing sensitivity and distinguishability to variations in viscosity. Therefore, this weighted-dependent fluorescence lifetime imaging technique not only introduces a novel approach for viscosity detection in glycerol-water mixtures but also provides a powerful analytical tool for various fields, including microfluidics, rheology, and research on novel functional materials.

Key words fluorescence lifetime, viscosity, weight dependence, glycerol

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0407