

数字化图像处理技术在平面色谱及芯片检测中应用的研究

梁冰, 敬小丽, 卢涛(四川大学化工学院制药与生物工程系, 四川 成都 610065)

摘要:目的 开发使用普通扫描仪/数码像机等就能作平面色谱分析、指纹图谱相似度计算、高密度点阵检测的多功能软件。

方法 根据数字化图像处理技术原理,用 Visual C++ 语言和 Delphi 语言编程。以改进的特征曲线重合率公式计算相似度。

结果 能给出平面色谱定性的 Rf 值; 能将平面色谱的可视及荧光斑点定量数值化; 能计算指纹图谱相似度; 能清晰分辨 6400 点/cm² 的可见光点阵, 及以 1 μg/mL 核黄素溶液点构的 64 点/cm² 的荧光点阵(每点 1 ng 核黄素); 待测图像文件格式可为 BMP 等通用格式; 数据自动列表, 可编辑, 可以 Excel 格式保存。

结论 系统性能良好, 整体优化水平高, 人机交换界面友好, 操作简便, 设备简单、价格低廉。

关键词: 数字图像处理; 平面色谱; 点阵; 指纹图谱; 相似度

Study on the application of digital image processing technique to the planar chromatography and array detection

LIANG Bing, JING Xiao-li, LU Tao(*Department of Bio-Engineering and Pharmaceutical-Engineering, Chemical Engineering College, Sichuan University, Chengdu 610065, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a multiple-function soft for Planar Chromatography analysis, calculation of similarity of Chinese traditional medicine's chromatographic fingerprint, detection of high density array, by using a cheap common scanner or digital camera/ultraviolet analyzer. **METHOD** Program basing on the principle of computer-associated digital image processing by using VC++ and Delphi language, calculate similarity using the modified coincident rate formula for characteristic curves. **RESULTS** 1) Rf value can be obtained; a visible and fluorescence spot can be transferred quantitatively into gray scale value; similarity of Chinese traditional medicine's fingerprint can be calculated; an visible array of 6400 dots/cm² and a fluorescent array of 64 dots/cm² constructed with a lactochrome solution of 1 μg/mL, about 1 ng lactochrome/dot, can be identified clearly. Formulation of a file can be Use BMP; Data can be listed automatically, and can be edited, and saved as an Excel file. **CONCLUSION** The system has excellent characteristics and optimized well as a whole, with a friendly human-machine exchange interface, simplicity of operation, cheaper apparatus.

KEY WORDS: digital image processing; planar chromatography; array; fingerprint similarity

平面凝胶电泳是核酸、蛋白质日常分离分析不可缺少的工具; 薄层扫描色谱是有机物、药物尤其是天然药物分离分析的主要手段; 生物芯片是基因测序与表达、基因诊断、药物

高通量筛选的现代先进技术。它们的信息获取均是以平面图像检测为原理, 即将色谱带或点阵点的光密度转化为与引起这些谱带或阵点的物质的量成比例的峰高或峰面积数值。

作者简介: 梁冰, 男, 1957 年 3 月生, 教授, 从事仪器分析、药物分析及天然产物分离研究。Tel: 028-85405221; Email: phar_bioeng@sina.com

因此,能够将计算机数字化图像处理技术运用于上述分析检测技术,使其容易实现自动化、信息化、定量准确化以及仪器小型经济化。国外对平面色谱图像处理软件的研发已普遍进入了商业化。而国内这方面的工作做得不多。

中药指纹图谱已成为当今国内外认同的中药质量评价和控制的有效方法。薄层色谱法的信息量大,操作简单,分析速度快,一次分析样品数量多,分析成本低,在中药质量控制中应用极为广泛,是构建中药指纹图谱的主要方法之一。相似度是中药指纹图谱的最重要指标,即引入相对指数、重叠率、N 强峰等量化数据来客观、科学、准确地比较两指纹图谱的相似程度。国内已开发出了柱色谱中药指纹图谱相似度计算软件。而薄层色谱法等平面色谱技术的检测原理完全不同于柱色谱,未见有薄层扫描色谱指纹图谱相似度软件报道。目前所见到的中药薄层扫描色谱指纹图谱均系直观比对,没有相似度定量指标。研究开发中药薄层扫描色谱指纹图谱相似度软件很有必要。

因此,本文在前期工作的基础上^[1],根据数字化图像处理技术的原理,运用 Visual C++ 语言和 Delphi 语言,研究开发了一个使用普通扫描仪和数码相机等廉价的硬件就能够进行平面色谱的定性定量分析、点阵图像检测、中药指纹图谱相似度计算的多功能数字化图像处理软件。

1 数字化图像处理软件的开发

程序包括图像读入显示模块、斑点的识别-多行图像分割、图像实时查看器、中值滤波、背景扣除、数据库模块、数据的输出模块、峰形图绘制模块、滤除杂质峰、计算模块。计算模块主要包括峰面积、峰高、比移值 Rf 以及相似度等的计算。

下面详细介绍相似度子模块。相似度 f 表示两个中药指纹图谱的相似程度。f 在 0~1 之间。f=1,表示两个中药指纹图谱完全一致。

1.1 共有峰的匹配

计算相似度前的谱峰匹配可根据样品的比移值 Rf 结合峰形状特点进行。本软件设置了四个条件来顺序地判断峰的匹配性。

1.1.1 $\Delta Rf \leq$ 阈值判据。 ΔRf 即考察中的一对峰的比移值之差,当小于某一允许阈值时就认为它们是匹配峰。 ΔRf 阈值的设定会直接影响指纹峰识别结果的准确性,故应该预先由平行性实验来确定。薄层色谱具有能够在相同条件下进行平行实验的特点,只要消除了边缘效应, ΔRf 一般会在 0.02~0.05 范围内。

1.1.2 h/w 无限接近判据。经第一个判据后,有可能会出待测指纹图谱中有一个以上的峰同时与对照指纹图谱的同一个峰相“匹配”的情形。因此,设立了第二个判据,即在候选的匹配峰中, h/w 最接近的两个峰为匹配峰。

1.1.3 h 无限接近判据。经前两判据后,采用本判据对候选匹配峰进行再优选。

1.1.4 出峰顺序判据。即已经被判定匹配的峰不能再与其它峰匹配。

1.2 相似度的计算

完成峰的匹配后,进行相似度的计算。指纹图谱相似度的计算方法不少,如相关系数法、距离系数法和向量夹角余弦法。

孟庆华等^[2]发现前两种方法与实际结果不能很好的吻合。并提出了一种能够克服上述两法之不足的新算法—经修饰的曲线重合率法,并实验证明了新算法能够更准确真实地反映两谱图之间的相似程度。公式如下:

$$f = \frac{2n_1}{n_1 + n_2} - \frac{2}{n_1 + n_2} \sum \left| \frac{h_{1i} - h_{2i}}{h_{1i} + h_{2i}} \right| \quad (1)$$

式中 n_1, n_2 分别为两待比较色谱指纹图谱中实际色谱峰数, n_i 表示两待比较指纹图谱的共有峰(即匹配峰)数, h_{1i} 和 h_{2i} 表示共有峰强度(峰高或峰面积)。式中第一项是两图谱中的匹配峰总数占总峰数的分数,即两图谱的重叠率^[3,4];第二项表示共有峰强度差异对相似度降低的程度。上式考虑了色谱指纹图谱的整体性,无须对比移值数据进行标准化等预处理,因而使计算简化,判断准确,不需要复杂的模式识别方法,易于编制计算机软件。

因此,本文根据式(1)编写出了平面色谱指纹图谱相似度软件。软件把待比较的各谱图显示在同一坐标图上,用户可选择峰高或峰面积为据,在人机对话框中输入 ΔRf 阈值,软件就计算出了每两谱图间的相似度,结果以表格表示。

1.3 相似度软件的考察

为了防止程序编写上的错误,对其进行如下的考察。首先,虚拟一对完全一致的由十峰构成的谱图,程序计算所得的相似度是 1,与预想的一致。此外,对两幅完全一样的真实图像—鸡血藤薄层扫描荧光图像,软件计算得到的相似度也为 1。

两个不同图形间的相似度小于 1。这时,用真实的图像很难考察软件计算出来的相似度是否能够反映出该两图像之间的差异。因为本来就不知道相似度该是多少。而虚拟图像可使该问题简单地得到考察。

对于相差一个峰,其余九峰相同的两虚构谱图,以峰高为参数,据式(1)手工计算的相似度为 0.947,而软件算出来的也是 0.947,相互吻合。

对于有九个峰相同,而有一峰峰高相差一半的两虚构谱图,以峰高为峰强度时,手工算出来的相似度为 0.967,这和本软件计算结果一致。

2 数字化图像处理系统的应用与结果讨论

2.1 点阵图像

对点阵图像的处理能更容易考查图像软件的优劣程度。

2.1.1 高密度可见点阵 用本软件处理以 2500dpi 的分辨率扫描约 6400 个点/cm² 的可视点阵(图 1a),以第三行的处理结果为例(图 1b),峰位置、大小高低及数量与斑点位置、大小深浅及数量相吻合,说明本软件能分辨识别高达 6400 个/cm² 左右的点阵,每点的面积不足 0.015mm²,这已经相当于生物芯片中的高密度点阵范畴。现在,普通扫描仪的分辨率已高达 6400dpi。本数字图像处理系统处理更密集

点阵的能力还可进一步改善。

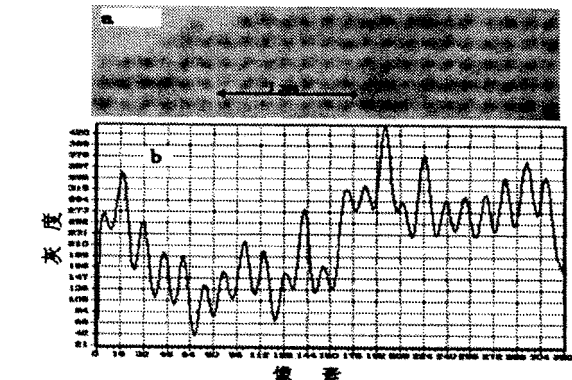


图1 可见光点阵图(a)及第三行峰形图(b)

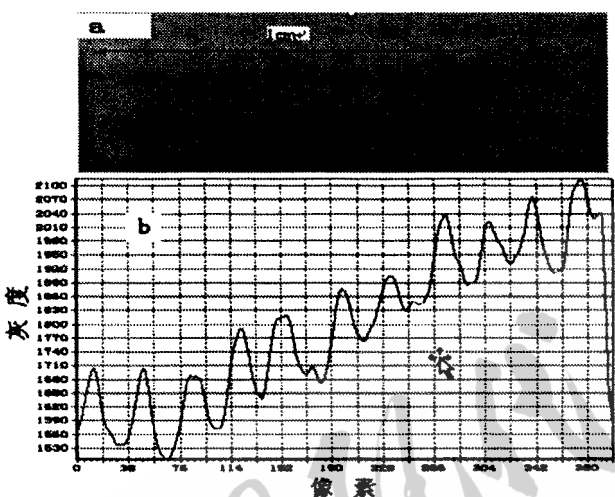


图2 荧光点阵图象(a)及第三行峰形图(b)

2.1.2 荧光点阵 荧光检测的灵敏度高,所以生物芯片大多是用荧光物质来标记待测分子。如下考察本软件处理荧光点阵图像的可行性。

用钢笔将 1mg/mL 的核黄素(5%醋酸)溶液在滤纸上点阵,紫外分析仪照射下,320 万像素的数码相机拍照得到图 2a,以本软件处理得图 2b。

因是用钢笔手工点阵,加上滤纸的扩散,斑点较大,密度不高,约 64 个点/cm²。但可以看出,峰数与斑点数,峰位置与斑点位置完全对应,峰高明显。本数字图像处理系统已具有应用于生物芯片检测的可能性。

用微量注射器将 5mg/mL 的核黄素(5%醋酸)溶液,在滤纸上点 2 ~ 10ml 体积的 5 个点以考查其工作曲线,相关系数为 0.9984,线性良好;8ml 点样量平行点样 5 次,结果峰高的 RSD 为 1.8%,而峰面积的 RSD 为 2.4%,精密度均较好。

2.2 薄层色谱

2.2.1 定性定量分析 按双硫脲-金属螯合物薄层色谱法,在掺有 KAc 的硅胶 G 板上点样 Zn、Cd、Co、Ni 混合标准溶液 2 ~ 6μL,按相应条件展开,扫描,用软件处理。结果表明,各元素的工作曲线的线性关系良好,回归曲线的相关系数均在 0.99 以上。并成功地应用到含朱砂中成药中这几种金属元素的同时测定。

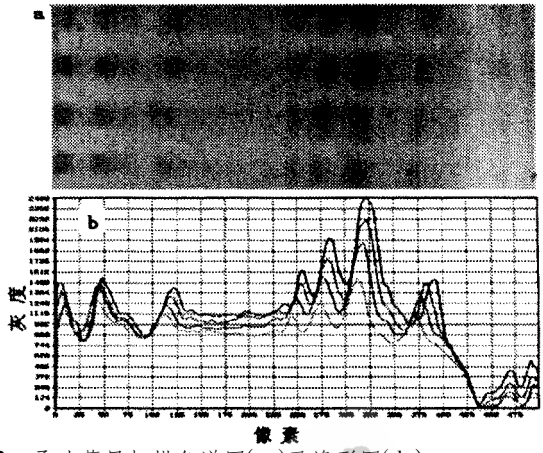


图3 桑叶薄层扫描色谱图(a)及峰形图(b)

2.2.2 中药桑叶指纹图谱(荧光) 以桑叶的平行实验来考察薄层扫描色谱中药指纹图谱的板内精密度。将处理后的桑叶供试品溶液在同一块板上平行点 4 个样,用甲苯-氯仿-甲醇溶剂展开,在紫外分析仪下,数码相机照像得到图 3a,软件处理得图 3b。

四行间对应点的 ΔR_f 在 0.004 ~ 0.042 范围,以峰高为强度, ΔR_f 阈值取 0.05,计算得相似度在 0.926 ~ 0.681 之间。改善 ΔR_f 应从化学分离方面进行。改善相似度除主要从改善 ΔR_f 着手外,数码相机照像时的受光均匀性也应该重视。

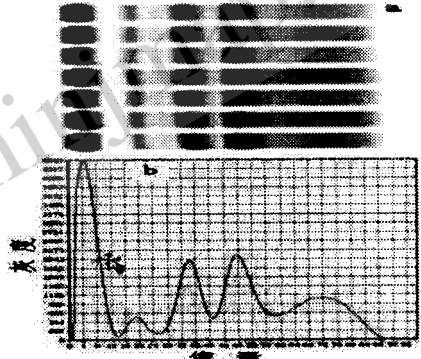


图4 血清蛋白凝胶电泳图

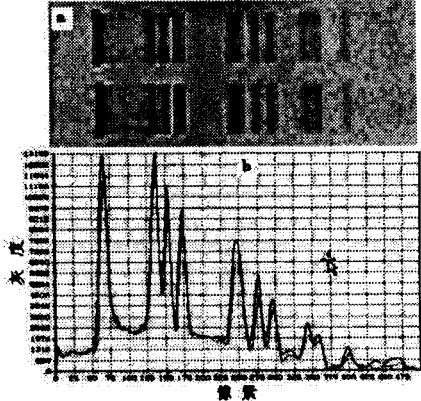


图5 甘蛋白凝胶电泳图(a)及峰形图(b)

2.3 平面凝胶电泳

例 1,图 4a 是常见血清蛋白的平面电泳分析扫描图(琼脂凝胶,氨基黑染色)。考察电泳扫描图最上一行,从可以看

出,本软件处理的结果(见图 4b)与实际情况相符。

例 3,图 5a 是某蛋白样品平行点样的平面凝胶电泳扫描图。峰形图(图 5b)已能很好分开,且与扫描图相对应,相似度为 0.904。显示了肉眼不能察觉的微小差异。

3 结论

综上所述,本数字化图像处理系统(普通扫描仪或数码相机/紫外分析仪+本软件)能够:

1)给出薄层色谱的定性指标 R_f 值。能将薄层扫描色谱、平面凝胶电泳图像斑点(包括可视图像、紫外荧光图像)的颜色深浅和大小准确定量地转化为灰度值,相关系数大于 0.99。

2)进行中药薄层扫描色谱及平面凝胶电泳指纹图谱相似度的计算与比较。指纹图谱的文件格式可以是 BMP、JPG、GIF 等 WINDOWS 通用格式。

3)清晰分辨密度达 6400 点/cm² 的可视光点阵;清晰分辨以 1 μ L/mL 的核黄素溶液点构成的 64 点/cm² 的荧光点阵,核黄素质量为 1ng/点。

4)引入了数据库,数据自动列表,能进行编辑,且可以 Excel 的格式保存,为文档处理和工作曲线的绘制提供了极大的方便。

5)程序整体优化水平高,功能强大,人机交换界面友好,操作简便。

参考文献

- [1] 何瑾等. 办公用扫描仪在分析化学中应用的基础研究[J]. 四川大学学报, 2003, 35(2): 68.
- [2] 孟庆华, 刘永锁, 王健松等. 色谱指纹图谱相似度的新算法及其应用[J]. 中成药, 2003, 25(1): 4.
- [3] 洪筱坤, 王智华. 色谱指纹图谱在中药质量标准研究中的应用[J]. 中成药, 2001, 23(3): 157.
- [4] 洪筱坤, 王智华, 李旭. HPLC 相对保留值指纹谱法鉴别大黄[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(11): 650.

收稿日期: 2004-06-27