



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102017058 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 200980117616. 4

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

(22) 申请日 2009. 05. 04

代理人 李玲

(30) 优先权数据

0808876. 7 2008. 05. 15 GB

(51) Int. Cl.

H01J 49/00(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/003175 2009. 05. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02009/138179 EN 2009. 11. 19

(71) 申请人 塞莫费雪科学(不来梅)有限公司

地址 德国不来梅

(72) 发明人 M·M·萨维斯基 R·佐巴瑞夫

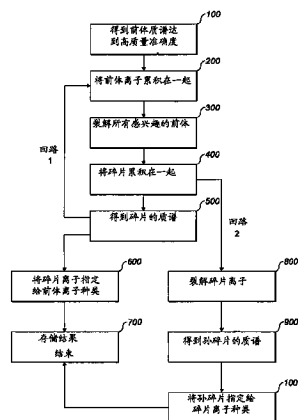
权利要求书 4 页 说明书 15 页 附图 7 页

(54) 发明名称

MS/MS 数据处理

(57) 摘要

一种从前体离子种类的碎片来识别这些前体离子种类的方法包括获得多个前体离子种类以及它们的碎片的质谱,该质谱达到高质量准确度。然后,扫描从裂解多个前体离子种类获得的该碎片质谱,它识别出其组合质量与这些前体离子种类中的一个的质量相匹配的多个碎片对。一旦已经将多个碎片离子对与前体离子相匹配,将复合的碎片离子谱分解成多个部分,每个碎片对一个部分。继续进行分析直到没有进一步的对被识别出。然后将该复合碎片谱的分解的多个部分整合在一起对于每个前体样本离子重构一种简化的碎片离子谱。将这些得到的重构的简化的碎片谱发送给一种搜索引擎,该搜索引擎返回对每个合成的碎片离子谱的可能候选者的一个分数分类列表。



1. 一种从前体离子种类的碎片来识别这些前体离子种类的方法，该方法包括：

(a) 确定表示多个前体离子种类的质量的一个量；

(b) 将该多个前体离子种类的离子裂解以形成从该多个前体离子衍生出的多个碎片离子；

(c) 对从多个前体离子种类衍生出这些碎片离子一起 / 同时进行质量分析；

(d) 将多个碎片离子种类的一个或多个样本集合指定给该多个前体离子种类中的特定一个，该样本集合或每个样本集合包括多个碎片离子种类，这些碎片离子种类在步骤 (c) 中所确定的组合质量与这些碎片离子种类所指定的这些前体离子种类中特定一个的组合质量相对应；

(e) 对于这些前体离子种类中的一个或多个，将识别 (i) 在步骤 (a) 中所识别的该特定前体离子种类的质量，以及 (ii) 对于该特定前体离子种类在所指定的样本集合或每个指定的样本集合中该多个碎片离子种类的质量的样本数据传送给一个比较装置，用于对应地将表示该前体和所指定的碎片离子种类的质量的多个量与在参比碎片离子数据和参比前体离子数据的一个或多个参比集合中代表离子质量的多个量进行比较；并且

(f) 从该比较装置接收表示所述比较的结果的信息，该信息试图识别出已经对其指定了该多个碎片离子种类的前体离子种类。

2. 如权利要求 1 所述的方法，进一步包括提供该前体离子种类的一种表示的步骤，即该前体离子种类被认为是一个可能的候选前体离子种类，从该候选前体离子种类中衍生出碎片离子种类的该样本集合或者一个特定的样本集合。

3. 如权利要求 2 所述的方法，进一步包括：

提供多个可能的前体离子种类的一种表示，从这些可能的前体离子种类中衍生出在一个特定样本集合中的碎片离子种类；连同那个碎片离子样本集合与对应的多个前体离子种类中的每一个的匹配相似度的一种表示。

4. 如以上权利要求中任何一项所述的方法，其中确定表示多个前体离子种类的质量的一个量的步骤 (a) 包括：

分离一个第一前体离子种类的多个离子；

分离至少另一种前体离子种类的多个离子；并且

将已分离的每个前体离子种类的至少一些离子裂解，以便形成从所述多个前体离子衍生出的所述多个碎片离子。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其中分离一个第一前体离子种类的多个离子的步骤与分离该另外的或每个另外的前体离子种类的多个离子的步骤是在不同的时间执行的。

6. 如权利要求 5 所述的方法，进一步包括将所分离的该第一前体离子种类的这些离子与所分离的该另外的或每个另外的前体离子种类的这些离子一起进行存储，并且一旦已经存储了该多个不同的离子种类的这些离子时，将每个前体离子种类的这些离子的至少一些基本上同时进行裂解。

7. 如权利要求 4 所述的方法，进一步包括从该另外的或每个另外的前体离子种类的这些离子的一个裂解物上分别地对该第一前体离子种类的这些离子的至少一些进行裂解；并且将从每个前体离子种类得到的这些碎片存储在一起作为从所述多个前体离子衍生出的所述多个碎片离子。

8. 如以上权利要求中任何一项所述的方法, 进一步包括: 在指定多个碎片离子种类中的一个或多个样本集合的步骤 (e) 之后, 从对于该前体离子种类所指定的碎片离子的一个或多个集合对每个前体离子种类构建一个碎片离子的部分质谱的步骤; 其中参比碎片离子数据的该参比集合或每个参比集合是一个参比碎片离子质谱, 并且其中传送该样本数据的步骤 (f) 包括传送碎片离子的该部分质谱用于将其与该参比碎片离子质谱或每个参比碎片离子质谱进行比较, 并且传送该对应的前体离子种类的质量或与其相关的一个值, 以试图识别所述前体离子种类。

9. 如权利要求 8 所述的方法, 进一步包括以下步骤:

获取该多个前体离子种类的一个前体质谱; 并且

将该前体样本质谱的精细结构与所构建的碎片离子质谱的精细结构进行比较, 以试图使所构建的碎片离子质谱的精细结构中的特定一个与该前体质谱中的特定一个的精细结构相关联。

10. 如以上权利要求中任何一项所述的方法, 进一步包括将这些前体离子和碎片离子之一或二者去同位素并且去电荷的步骤。

11. 如以上权利要求中任何一项所述的方法, 其中指定多个碎片离子种类的步骤 (d) 包括识别多个碎片离子种类, 它们的总质量与这些前体离子种类中的一个的质量的对应程度是使在该前体离子种类的质量周围的一个质量窗口内, 或者它们的总质量与作为从这些前体离子种类中的一个的预定偏差的一个质量的对应程度是在该偏差前体离子种类的质量周围的一个质量窗口内。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中该质量窗口选自以下表, 包括: 百万分之 20 (ppm)、10ppm、5ppm、2ppm、1ppm、0.5ppm、以及 0.2ppm。

13. 如以上权利要求中的任何一项所述的方法, 其中在一个第二循环中重复步骤 (a) 至 (f), 并且其中指定多个碎片离子以及传送样本集合用于比较的步骤 (d) 和 (e) 是在该第二循环之前从一个第一循环中的步骤 (a)、(b)、和 (c) 中获得的一个第一数据集进行的, 而该第二循环的步骤 (a)、(b)、和 / 或 (c) 中的一个或多个的至少一部分是同时进行的。

14. 如以上权利要求中任何一项所述的方法, 进一步包括对同一种已识别的前体离子在一个或多个后续循环中重复步骤 (a) 至 (f), 但是其中, 在每个情况下, 裂解那些相同的前体离子的步骤 (b) 包括使用不同的裂解能量和 / 或裂解机制。

15. 如以上权利要求中任何一项所述的方法, 进一步包括将步骤 (d) 之后仍然未被指定的任何碎片离子忽视或者丢弃。

16. 如权利要求 1 到 14 中的任何一项所述的方法, 进一步包括当任何一个单一碎片离子种类的质量是使其表示该碎片离子种类只能可行地来自于一种特定的前体离子种类时, 将该单一碎片离子种类直接指定给该特定的前体离子种类。

17. 如以上权利要求中任何一项所述的方法, 其中将该前体离子和碎片样本离子的质量在 5000 或更高的一种分辨率下确定为达到 20ppm 或者更高的一种质量准确度。

18. 如权利要求 17 所述的方法, 其中将该前体离子和碎片离子的质量确定为达到选自下表的一种质量准确度, 该表包括: 在 5,000 或更高、10,000 或更高、25,000 或更高、50,000 或更高、100,000 或更高的一种分辨率下, 10ppm 或更高、5ppm 或更高、2ppm 或

更高、1ppm 或更高、0.5ppm 或更高、0.2ppm 或更高、以及 0.1ppm 或更高。

19. 如以上权利要求中的任何一项所述的方法，在将该碎片离子数据和前体离子数据传送到该比较装置的步骤 (e) 与接收从该比较装置返回的信息的步骤 (f) 之间，进一步包括以下步骤：

将已经指定到这些前体离子种类中的特定一个的该多个碎片离子种类的一个或多个样本集合的质量（或一个相关的量）与在该参比碎片离子数据的一个或多个参比集合中的离子的质量（或对应的相关的量）进行比较，已经从已知身份和 / 或质量的对应的前体离子种类衍生出了每个参比集合，以试图识别从中已经衍生出的该多个被指定的碎片离子种类的该前体离子种类和 / 或与该前体离子种类相关的材料。

20. 如权利要求 19 所述的方法，进一步包括：在该比较步骤之后，识别出该多个碎片离子已经与其相关联的前体离子种类，和 / 或与该前体离子种类相关的材料的步骤。

21. 如权利要求 19 所述的方法，进一步包括：在该比较步骤之后，基于所述比较生成可能的候选前体离子种类的一个列表的步骤。

22. 如权利要求 19、20 或 21 中的任何一项所述的方法，其中，对于碎片离子的多个分离的样本集合中的每一个，而每个该分离的样本集合具有与多个碎片离子种类的质量相关的数据，对于一种特定的样本集合，这个或这些碎片离子种类被识别为从多个前体离子中的对应的一个衍生出，该比较步骤包括以下步骤：

将每个所述样本集合中的这些碎片离子的质量（或一个与其相关的量）与参比碎片离子数据的多个参比集合中的离子的质量（或一个与其相关的量）进行比较，以试图分别识别出对应地从中衍生出每个样本集合的最可能的前体离子种类，或者与其相关的一种分子。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中该比较步骤包括：

将一个第一样本集合中的离子的质量（或一个相关的量）与该多个参比集合中的离子的质量（或一个相关的量）进行比较，然后将另外的 $n(\geq 1)$ 个样本集合中的离子的质量（或一个相关的量）每一个顺序地与该多个参比集合中的离子的质量（或一个相关的量）进行比较，以试图进而识别出从中对应地衍生出该 $(n+1)$ 种样本集合中的每一种的最可能的前体离子种类，或者与其相关的一种分子。

24. 如权利要求 19 至 23 中的任何一项所述的方法，其中该比较步骤在远离前述步骤 (a) 至 (e) 以及该后续步骤 (f) 下进行。

25. 如权利要求 19 至 23 中的任何一项所述的方法，进一步包括：以一种被所述比较装置优选的格式向该比较装置提供与该前体离子和 / 或碎片离子的质量相关的信息。

26. 如权利要求 25 所述的方法，进一步包括：在将所述信息提供给该比较装置之前，将与该前体离子和 / 或碎片离子的质量相关的信息从一个第一格式转换为一个第二格式。

27. 如以上权利要求中任何一项所述的方法，其中与该前体离子和 / 或碎片离子的质量相关的信息或者是其质量，或其质荷比。

28. 如权利要求 1 至 26 中的任何一项所述的方法，进一步包括：将与该前体离子和 / 或碎片离子的质量相关的信息转换为多个质量单位，并且可任选地，进一步包括：为加合物或中性丢失调整质量。

29. 如以上权利要求中任何一项所述的方法，其中指定多个碎片离子种类的一个或多个样本集合的步骤 (d) 包括从由该多个前体离子衍生的该多个碎片离子中指定多个碎片离子种类对的一个或多个样本集合，该样本集合或每个样本集合中的该碎片离子种类对具有与该多个前体离子种类中的一种的组合质量相对应的组合质量。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其中当该对或每对的质量与该一个或多个前体离子种类中的的质量相对应时，指定多个碎片离子种类对的该样本集合或每个样本集合的步骤包括：当该对或每对的质量是通过一个预定的量从该多个前体离子种类中的这一种进行偏差时，指定多个碎片离子种类的该样本集合或每个样本集合。

31. 如以上权利要求中任何一项所述的方法，进一步包括：在裂解该多个前体离子种类的多个离子的步骤 (b) 之后，另外的步骤为：

(g) 裂解该多个碎片离子从而形成多个孙碎片离子；

(h) 对这些从多个碎片离子种类衍生的孙碎片离子一起 / 同时进行质量分析；

(i) 将多个孙碎片离子种类的一个或多个样本集合指定给从中形成那些孙碎片离子的该多个碎片离子种类中的特定一个，多个孙碎片种类的该样本集合或每个样本集合包括在步骤 (h) 中确定的它们的组合质量与其上指定那些孙碎片离子种类的这些碎片离子种类中的特定这一种的组合质量相对应的孙碎片离子种类；

(j) 对于这些碎片离子种类中的一个或多个，将标识 (i) 已识别的特定碎片离子种类的质量，以及 (ii) 用于对于该特定碎片离子种类在所指定样本集合或每个指定样本集合中的该多个孙碎片离子种类的质量的样本数据传送给一个比较装置，用于将表示该碎片离子种类和指定的孙碎片离子种类的质量的多个量与在参比孙碎片离子数据和参比碎片离子数据的一个或多个参比集合中的表示离子质量的多个量对应地进行比较；并且

(k) 从该比较装置接收表示所述比较的结果的信息，该信息已经试图识别已经在其上指定了该多个孙碎片离子种类的碎片离子种类。

32. 如以上权利要求中任何一项所述的方法，进一步包括：

识别一个第一多个前体离子种类，其形成了可用于分析的全部前体离子种类的一个子集；

对已识别的第一多个前体离子种类执行该方法步骤；并且

对于可用于分析的全部前体离子种类中的前体离子的至少一些重复该方法步骤，并且这些前体离子不包括在其所述子集中。

33. 一种计算机程序，当运行时，它致使一个或多个处理器执行以上权利要求中任何一项中所述的步骤。

34. 当载入权利要求 33 中所述的计算机程序时，一种用于一种质谱仪的控制器。

35. 一种质谱仪，该质谱仪包括权利要求 34 所述的控制器。

MS/MS 数据处理

发明领域

[0001] 本发明总体上涉及质谱领域，并且更确切地涉及一种从前体离子种类的碎片来识别这些前体离子种类的方法（MS/MS 数据处理）。

[0002] 发明背景

[0003] 由于存在具有非常相似的质荷比的许多不同的分子，分子的质谱分析是复杂的。已经研发了多种裂解技术通过测量它们的特征性碎片的质核比来帮助识别不同的母分子。将感兴趣的分子的离子连同具有非常相似的质荷比的其他分子离子通过一个质量选择性离子光学装置根据质荷比进行选择。这些离子被称作母离子或前体离子。然后使用一种或多种方法将这些母离子裂解，并且对碎片离子进行质量分析，从而提供一个所谓的 MS/MS 质谱。具有不同结构的分子典型地裂解形成不同的碎片离子，并且通过研究那些碎片离子的质荷比可以识别这些母分子。当碎片质谱同样包含干扰时，或者当要求比 MS/MS 中存在的信息更多的信息量时，可以使用更多级的裂解，生成 MSⁿ 质谱。已经研发了多个蛋白质序列库，并且使用为此目的开发的算法对这些库进行搜索来使碎片离子谱与可能的母分子相匹配。

[0004] 在有机质谱法中，这是一种强有力的并且使用广泛的方法。然而，它具有某些缺点，这涉及要求多于一个质量选择步骤。这个要求增加了用于执行该方法所要求的仪器的复杂度，并且增加了分析的时间。

[0005] 除了使用离子裂解技术来使得母分子离子能够被识别之外，可以使用一个高质量分辨率的质谱仪来在具有非常相似的质荷比的分子离子之间进行区分。然而，通常此类高质量分辨率的质谱仪与它们的低分辨率的对应物相比是更昂贵的并且经常是慢的多的（由于更长的测量时间）。

[0006] 如果碎片离子质谱具有高的分辨率以及高的质量准确度，能够以更高级别的置信度进行碎片离子和可能的母分子之间的匹配。因此，为了最有效地识别大分子离子，分析者们通常使用一种高分辨率的质谱与裂解方法的组合。然而，将这两种方法组合导致了甚至更长的分析时间。

[0007] 诸如以上概述的那些方法被常规地用于包含蛋白质的样本。典型地，将蛋白质进行消化从而产生多肽，并且将这些多肽电离并且引入质谱仪中。

[0008] 将目标蛋白质或混合物（例如细胞裂解产物）进行预处理。预处理可以包括过滤或清洗。然后用适当的裂解试剂将它消化掉。最常使用的是胰蛋白酶，但是也使用其他的，如胰凝乳蛋白酶、溴化氰、亚碘酰苯甲酸盐。在消化并可能清洗之后，将混合物放入质谱仪中，通常在色谱分离之后。色谱分离通常限制了可供串联的质谱过程使用的时间。每个峰的色谱时间范围是从 30 秒到小于 1 秒，其中的趋势是时间更快。

[0009] 首先取得一个完整的质谱，从而生成一个所谓的前体离子谱。在该前体离子谱中对于每个离子种类可以获得多个碎片离子谱（数据独立的 MS/MS）。可替代地，经常使用的一种方法是“依赖数据”的 MS/MS。在这种方法中，获得一个完整的谱，并且然后选出一个或多个最强的峰，这通常是自动进行的并且逐个地进行 MS/MS 裂解。将

这些前体和碎片图谱存储起来。对此不同的增强包括：用于避免重复测量强离子对前体建立临时性黑名单；用于避免收集众所周知的肽类或溶剂组分的 MS/MS 数据对前体建立永久性黑名单；对所感兴趣的质量建立白名单，以便在甚至不满足最苛刻的标准时允许进行裂解。然而，对于这种依赖数据依赖的 MS/MS 方法存在两个问题。首先，对同一个样本的不同次的处理可能产生非常不同的结果，这是因为（例如）即使是前体离子谱中的峰高度的小的变化也可能导致自动地做出的不同的决定，从而导致选择不同的前体离子种类用于裂解。其次，在许多情况下，由于之前的色谱过程，在可供使用的窗口内可能没有足够的时间来裂解所有感兴趣的离子。

[0010] 在图 1 的流程图中作为一个实例示出了其中选择两个前体离子用于 MS/MS 的现有技术的依赖数据过程。

[0011] 测量之后，或者有时在测量过程中，对所获得的数据进行评估。对此许多种方法是已知的，如 (1) “从头测序法”，在该方法中，从图谱中直接推断出氨基酸序列；(2) “序列标记法”，在该方法中，仅有部分氨基酸序列从谱中直接推断出来，并且这些小段（“多个标签”）被用于数据库搜索例行程序中；(3) 仅使用碎片离子谱来进行直接的数据库搜索。

[0012] 进行数据库搜索从而将碎片离子与它们可能的肽前体相匹配。已经研发出多种自动例行程序来进行这些搜索。其结果是多个可能前体的一个列表，该列表上用分数表示匹配的可信度。可任选地，能够将搜索限制到已知的相关的肽前体的用户可以预先选择有待搜索的数据库，例如，对于酵母的那些肽前体，其中该样品已知来自一种酵母。可任选地，计算机搜索还可以提供从肽的得分中计算出的蛋白质的得分用以给出包含在预先消化的样本中的可能的蛋白质的一种指示。典型地，搜索算法返回蛋白质或肽候选者连同它们的分数的一个按分数分类的列表。然后典型地将该解译交给用户。

[0013] 标准的方法是将每个 MS/MS 谱连同对应的前体质量（通常这是在依赖数据设置中触发 MS/MS 事件的质量）的一个峰值列表提交给一个“搜索引擎”用于与一个数据库进行比较。通常在质量选择窗口中不进行多于一个的前体的检查。许多蛋白质的数据库是公开可得到的。它们中的一些直接包含来自以前分析的蛋白质，其他的（例如 SwissProt (<http://expasy.org/sprot/>)）是基因组序列的计算机翻译。

[0014] 由于搜索引擎使用的最终目标是提供一个或多个在被分析物的混合物中被确定的蛋白质，数据库中的蛋白质被“电子地消化”为具有与用户选择的裂解试剂相匹配的性质的多肽。这种“硅内的消化”可以即时生成，或者作为进行实际搜索之前的一个“索引”步骤。所有在由用户定义或从数据中推断出的一个容忍窗口内与前体质量相匹配的肽都被认为是“候选者”。然后对来自这些候选者的碎片离子进行预测。基于 MS/MS 数据，分数是与这些候选者相关联的，当 MS/MS 碎片离子谱包含所预测的候选者的所预测的碎片时，产生一个更高的分数。

[0015] 现有技术数据库搜索过程作为一个实例示于图 2 的流程图中。

[0016] 如果故意地或者无意地同时选择了多于一个的前体离子种类用于裂解，碎片离子谱将会是更复杂的并且来自数据库搜索引擎的结果将会是更不准确的。

[0017] 在图 1 和 2 中描述的现有技术过程具有以下缺点，即：用于获得可能的肽的按分数分类的列表的时间是缓慢的，即使是在使用了这些依赖数据的方法时，因为在可以使

用标准搜索引擎技术对它们进行处理之前，必须单独地选出每个感兴趣的前体离子并且个别地进行裂解，并且依次地对产生的离子质量进行分析。由于仪器时间是昂贵的，所以这是费用昂贵的，并且由于在该过程中消耗掉了相对大比例的样本（它可能仅以非常小的量存在），所以它是不浪费的。

[0018] Masselon 和 Smith 在 *Analytical Chemistry* (分析化学) 2000 年的第 72 卷第 8 号的 1918-1924 页描述了一种特定的提高通量的方法。在这个方法中，进行了一种多路复用形式。来自多于一个的前体的多个碎片离子被有意地在一个单一的质谱中进行测量，该质谱具有非常高的质量准确度。然后该碎片离子谱中确实包含了来自多于一个的前体离子种类的多个碎片。像通常一样，将这个谱图发送到数据库搜索引擎，并且该方法依赖于碎片谱的高质量准确度，这使得大多数碎片离子能够被归于一种特异性的母多肽，尽管可能不是每个碎片离子种类都能够被指定给一个母体。

[0019] Masselon 和 Smith 的方法有几个缺点。如上所指出的，当通过标准搜索引擎方法处理来自多于一个的前体离子种类的多个碎片离子谱时，因为这些碎片离子谱更复杂，来自数据库搜索引擎的结果是更不准确的，即使已经使用了高质量准确度。此外，不仅分数是更不准确的，将会产生远多得多的数目的假阳性识别。由于碎片离子谱的复杂性，大大降低了搜索引擎的速度。

[0020] 本发明试图解决现有技术的 MS/MS 数据处理的这些以及其他问题。

[0021] 发明概述

[0022] 针对这种背景，并且根据本发明的一个第一方面，在此提供了一种从前体离子种类的碎片来识别这些前体离子种类的方法，该方法包括：

[0023] (a) 确定表示多个前体离子种类的质量的一个量；

[0024] (b) 将该多个前体离子种类的离子裂解以形成从该多个前体离子衍生出的多个碎片离子；

[0025] (c) 对从多个前体离子种类衍生出这些碎片离子一起 / 同时进行质量分析；

[0026] (d) 将多个碎片离子种类的一个或多个样本集合指定给该多个前体离子种类中特定的一个，该样本集合或每个样本集合包括多个碎片离子种类，这些碎片离子种类在步骤 (c) 中所确定的组合质量与这些碎片离子种类所指定的这些前体样本离子种类中特定的一个的组合质量相对应；

[0027] (e) 对于这些前体离子种类中的一个或多个，将识别 (i) 在步骤 (a) 中所识别的该特定前体样本离子种类的质量，以及 (ii) 对于该特定前体离子种类在所指定的样本集合或每个指定的样本集合中该多个碎片离子种类的质量的样本数据传送给一个比较装置，用于对应地将表示该前体和所指定的碎片离子种类的质量的多个量与在参比碎片离子数据和参比前体离子数据的一个或多个参比集合中代表离子质量的多个量进行比较；并且

[0028] (f) 从该比较装置接收表示所述比较的结果的信息，该信息试图识别出已经对其指定了该多个碎片样本离子种类的前体离子种类。

[0029] 因此，多路复用再次被用作提高通量的方法，并且从多于一个的前体离子种类衍生出的多个碎片离子中得到碎片离子数据（如碎片质谱）。碎片离子数据以及前体离子数据二者都优选地是以高质量准确度（例如对于碎片和前体样本离子数据，在分辨率在

FWHM 处为 100,000 下, 小于 5ppm, 最优的, 小于 2ppm) 获得的。然而, 在这个所产生的碎片离子数据上不是使用数据库搜索引擎, 而是进一步对它进行处理。在这个额外的处理步骤中, 对多个碎片进行碎片离子数据的搜索, 这些碎片的组合质量在某些准确度限度内与在该前体离子数据中发现的前体离子质量的组合质量相匹配。例如, 这些准确度限度可以从碎片以及母离子数据的质量准确度来确定。已经将多个碎片离子的一个或多个集合与前体离子种类相匹配, 将这些碎片离子数据分解成多个部分, 每个前体离子种类一个部分, 并且该部分仅包含指定到该特定的前体离子种类的碎片离子种类的这个或这些集合。在多个优选实施方案中, 这个过程有效地允许从前体离子种类重建简化的碎片样本离子谱。例如, 对于每个前体离子种类可以产生一个碎片离子谱, 就好像对于每个前体离子种类一次一个地获得了 MS/MS 谱。这个过程将该多路复用过程去卷积, 但是保持了由该多路复用过程获得的所有速度优势。然后这些得到的碎片离子数据的样本集合(例如, 去卷积的碎片离子谱)优选地一个接一个地发送到数据库搜索引擎, 该数据库搜索引擎对每一个进行标准的数据库搜索, 在多个优选的实施方案中, 对于每个去卷积的碎片离子谱给出可能的候选者的一个按分数分类的列表。

[0030] 因此本发明的方法极大地提高了来自数据库搜索引擎的结果的准确度。它还极大地提高了搜索的速度。

[0031] 术语“一起/同时进行分析”意味着该方法涉及到在同一时间或者大体上同一时间搜索来自多于一个的前体样本离子的碎片离子(无论那些碎片离子是通过多个前体的同时裂解而同时产生的, 还是通过将来自一个或多个前体的连续裂解的碎片累积在一起)。更具体地讲, 在此并非旨在暗示对碎片离子的实际检测/识别作为一个单一的事件发生。尽管在某些类型的质谱仪的情况下(如 FT-ICR 或 Orbitrap™ MS), 这些碎片离子是一起检测的, 但是在其他情况下(如 TOF-MS), 将这些离子顺序地喷射到一个检测器上。尽管如此, 分析本身(在检测之前)是在来自多于一种的前体的碎片离子上以串联方式进行的, 以允许上述的多路复用。

[0032] 此外, 应当理解的是, 尽管一些优选实施方案将确定该前体和/或碎片离子的质量(或者甚至是质荷比 m/z), 但是这对本发明的成功操作并非必不可少。可以测量许多不同的物理参数, 如(但不限于)飞行时间、频率、电压、磁场偏转等等(例如, 取决于离子检测所选用的方法), 每个参数与离子质量或 m/z 有关或者允许导出离子质量或 m/z 。然而, 不必在每个情况下计算出质量本身; 不将非质量空间中的测得参数转换为质量在计算上可以是更有效率的。此外, 存储在比较数据库中的量可以本身不作为一个质量来保持, 而是一个与质量相关的不同的量。因此术语“表示质量的一个量”应当被广义地解释为包含质量以及其他的多个量。

[0033] 优选地, 该方法包括将一对或多对碎片离子指定给一个特定的前体离子种类。这可以是基于同所指定的前体离子种类的质量相对应的这两种碎片离子种类的一种组合质量, 这是通过具有一个总质量, 它合计达到该前体离子种类的质量, 或者以其他方式通过具有来自该前体的一个预定的偏差的质量(例如, 在裂解过程中水分子的中性丢失的结果)而相对应。通过不同的裂解技术的识别出的这对指定的碎片可以被称作离子的“黄金对”。

[0034] 本发明的方法还揭示了在碎片样本离子数据中在前体离子谱中不能被指定给前

体离子种类的离子种类。然后将或者可以不将这些碎片离子种类发送到数据库搜索引擎。如果发送，它们可以单独发送，并且然后将不对样本集合中的其他去卷积的碎片样本离子数据的复杂性做贡献，这正如它们在现有技术方法中所做的。

[0035] 本发明对于 MS/MS/MS 技术或 MS^n 还可以获得速度和准确度优势。由于 Masselson 和 Smith 的现有技术的多路复用安排事实上要求对于前体和碎片离子二者都高的质量准确度，本发明的多个实施方案的方法相当于现有技术并没有另外的时间罚分（就数据收集而言），而相反它确实提供了显著更高的准确度。当然，相对于没有试图多路复用前体的先前的方法，本发明的实施方案提供了显著的时间节省。

[0036] 通过所附的权利要求以及以下的说明将会清楚本发明的进一步的特征和优点。

[0037] 附图简要说明

[0038] 图 1 展示了对于选择用于 MS/MS 分析的两种前体离子种类的现有技术的依赖数据过程的流程图；

[0039] 图 2 展示了现有技术的数据搜索程序的流程图；

[0040] 图 3 以框图的形式展示了适合用于实现本发明的实施方案的方法的一种示例性的质谱仪的概况；

[0041] 图 4 功能性地并且示意性地展示了适合用于实现本发明的实施方案的方法的一个第二示例性质谱仪；

[0042] 图 5 功能性地并且示意性地展示了适合用于实现本发明的实施方案的方法的另一种示例性质谱仪；

[0043] 图 6 仍然以功能性和示意性的形式展示了同样适合用于实现本发明的实施方案的方法的又一种示例性的质谱仪；

[0044] 图 7 展示了对于分子 $C_{22}H_{42}N_9O_6$ 以及它的碎片的质谱的一部分；

[0045] 图 8 展示了当对应地使用一种现有技术方法和一种根据本发明的方法时，通过实验的碎片数据识别前体离子种类的准确度的优值的绘图，为多路复用的样本碎片数据集合数目的函数；

[0046] 图 9 展示了当单独地获得时，以及当根据本发明的实施方案通过 4 个碎片样本离子数据集合的多路复用组一起获得时，1000 个 MS/MS 谱图的识别准确度的经实验确定的优值的分布；以及

[0047] 图 10 展示了对于多级裂解 (MS^n) 使用本发明的实施方案的方法的程序的流程图。

[0048] 优选实施方案的详细说明

[0049] 本发明的多个优选实施方案提供了一种通过前体离子种类的碎片来识别前体离子种类的方法。尽管产生碎片离子的方式本身不是关键的（并且确实，可任选地，可以在同样的前体离子上使用不同的裂解技术和能量从而得到不同的碎片离子种类），但是将首次描述用于裂解前体样本离子以及从这样一个过程中收集质谱数据的一种适当的技术，从而允许更好的理解本发明。然而，应当强调的是，对用于裂解前体离子的一种安排的一个优选实施方案的以下说明仅代表这样做的许多不同方法中的一个，并且此外检测这些离子的方式同样地能够以各种不同的方法来实现。

[0050] 首先参见图 3，展示了一种质谱仪 10。质谱仪 10 包括一个离子源 20，该离子

源用于生成有待质量分析的离子。图 3 中展示的离子源 20 可以是一个脉冲激光源（优选地，一个基质辅助激光解析电离（MALDI）源，其中通过来自一个脉冲激光源 22 的照射生成离子）、一个连续离子源（如一个大气压电喷射源）、或其他的源。

[0051] 将来自离子源 20 的离子容纳在一个离子阱 30 中，例如，该离子阱可以是如例如在 WO-A-2005/124821 以及更近的在 WO-A-2008/081334（通过引用将它们的内容合并在此）中描述的一个充满气的 RF 多极或一个弯曲的四极。

[0052] 将这些离子存储在离子阱 30 中，并且如例如在我们共同未决的申请号 WO-A-2006/103445（其内容也通过引用合并在此）中所描述的，可以进行离子的碰撞冷却。在离子阱 30 中发生存储直到将 RF 关闭并且在这些杆之间施加一个 DC 电压。在我们共同未决的申请（公开为 GB-A-2,415,541 以及 WO-A-2005/124821）中详细地陈述了这种技术，其详细内容全部合并在此。

[0053] 在一个第一循环中，将一定范围的前体离子（或者是连续跨过一定范围的 m/z 或者是一系列不相邻的质量）从离子阱 30 喷射到质量一个分析器 70，例如 Orbitrap、FT-ICR 或其他的高质量准确度分析器中。在该第一循环中对于从离子阱 30 喷射出的前体离子这产生了一个高质量准确度的前体样本离子质谱。这种前体样本离子质谱用于几个目的。首先，它可以用于识别有待分析的前体离子的一个子集（因为不是所有的前体离子都可能具有分析的价值）。其次，以高准确度获得前体谱，可以将一个测得的前体谱峰连同碎片离子数据一起发送用于分析，在以下进一步解释。

[0054] 在一个第二循环中，通过离子源 20 将离子阱 30 再次充满。再次将这些离子冷却。然而，这次不是对所有的前体离子一起进行质量分析，通过之前得到的前体样本离子的质谱，识别出单独的前体离子用于进一步的分析。为了分离这些已识别的前体离子，将离子阱 30 的内容物脉冲喷射到一个离子选择装置中，该离子选择装置优选地是一个静电阱 40。脉冲喷射产生狭窄的离子束。在静电阱 40 中捕获这些离子并且进行多次反射，（其中如我们共同未决的申请 GB0725066.5 和 WO-A-2007/122378 中所描述的）。

[0055] 从离子阱 30 到静电阱 40 的喷射通过离子光学器件（未在图 3 中示出）发生，其中对离子数目进行可选择地控制从而避免空间电荷的后续问题。

[0056] 在通过该离子光学器件加速之后，将这些离子聚集成对于每个 m/z 长 10 至 100ns 之间的短束，并且进入静电阱 40 中。在静电阱 40 中的每次反射上，或者在一定数目的反射之后，将不想要的离子脉冲偏转离开静电阱 40，比如到一个检测器 75 或到一个裂解单元 50 中。优选地，将离子检测器 75 置于邻近离子镜的飞行时间聚焦平面，此处离子束的持续时间最小。因此，仅将具有分析价值的离子留在静电阱 40 中。将继续进行进一步的反射从而增加邻近质量之间的分离，从而可以实现进一步窄化选择窗口。最终，具有与感兴趣的质荷比 m/z 邻近的质荷比的所有离子都被消除，在阱中留下了单一的前体样本离子种类，通过在该第一循环的分析中得到的前体质谱识别出该前体样本离子种类。

[0057] 然后，将静电阱中的那个单一的前体样本离子种类喷射到一个裂解单元 50 中。优选地，裂解单元 50 是一个分段的仅具有 RF 的多极，其中沿着其这些分段生成轴向的 DC 场。将选择出的前体样本离子从静电阱 40 中喷射到裂解单元 50 中，其具有足够的能量从而允许它们在裂解单元 50 中裂解。

[0058] 在裂解单元 50 中裂解后，将来自该第一前体离子种类的离子碎片传送到一个辅助的离子存储装置 60 中。如以下所说明的，将它们存储于此，同时进行后续循环。

[0059] 一旦已经将来自该第一前体样本离子种类的碎片离子存储在辅助离子存储装置 60 中，对于一个第二前体样本离子种类重复这些步骤。确切地说，在静电阱 40 中分离出一个第二前体样本离子种类（再次优选地基于之前得到的前体样本离子质谱进行选择），并且然后发送到裂解单元 50 中，并且裂解，然后如在前一个循环中一样，将这些碎片传送到辅助离子存储装置 60 中，在那里来自该第二前体样本离子的碎片与在那里的来自该第一前体样本离子的碎片一同被存储。

[0060] 可以如上进行的进一步的多个循环受到数据处理的限制（见以下对此的讨论）、受到空间电荷的限制、并且在辅助离子存储装置 60 中对于多个碎片离子受到总的离子存储时间的限制。

[0061] 一旦已经将多个碎片离子在辅助离子存储装置 60 中累积，将它们喷射回到离子阱 30 中，其中它们通过与最初喷射它们的前体的孔（详见前述的 WO-A-2007/122378 中所描述的）不同的一个孔进入该离子阱中。从这里将它们喷射到高质量准确度质量分析仪（例如 Orbitrap）70 中用于质量分析。一旦该质量分析完成，以以下描述的方式，将从对前体离子的质量分析中得到的数据连同从对所有的碎片离子的质量分析中得到的数据一起进行处理。该处理或者可以发生在本地（例如在控制或连接于质谱仪 10（未被示出）的一个本地计算机的处理器中），可以存储在本地用于后续的分析，和 / 或可以作为一个或多个数据文件被发送到一个远程地点用于在那里的后续处理，随后，将该处理的结果返回给质谱仪 10 的用户。

[0062] 上文说明了在一个第一循环中捕获来自多个前体样本离子的质谱数据，并且然后通过依次的循环中分离每个前体离子种类（从该前体样本离子质谱中识别出的感兴趣的前体离子种类），通过将来自每个前体离子种类的碎片离子的存储在一起将它们全体累积起来用于对它们的碎片质荷比的同时 / 并行的分析。然而，当然，应当理解的是，这仅是可以使用下面说明的技术对多个前体和碎片离子同时进行分析的一种方法。例如，不是分离单独的前体种类并且然后将这些累积在一起以用于裂解，可以在一个步骤中将所有的前体离子一起分离，例如使用 WO-A-2008/059246（其内容通过引用全部合并在此）中描述的过程。

[0063] 能够用许多不同的方法来实现前体的选择，这些方法可以分类为依赖数据的或数据独立的。例如，在一个数据独立的模式中，可以选择一种连续的质量范围（它可以包括或者可以不包括多个离子种类）。可替代地，可以选择一种不连续的质量范围，即，可以选择来自多个非邻近质量窗口的前体。在一个依赖数据的模式中，可以选择预定数目（如，4）的前体离子种类，并且例如，可以根据强度将其分类。可以使用“包含”和“排除”列表用于前体的挑选（这些列表对本领域普通技术人员而言将是熟悉的），并且这些可任选地可以是动态列表。可以使用其他的前体识别标准，例如 Kendrick 质量偏差（“质量亏损”）、对于 MS³ 的中性丢失、以及如此等等。最后基于某些标准可能初始地选择多个前体，并且然后对保留的前体离子进行一次额外的“保险”MSⁿ 扫描。

[0064] 就如何实现多路复用而言，同样应当理解的是，该方法同样地适用于单一前体离子（其中如上所述将所有碎片一起收集在辅助离子存储装置 60 中）的连续分析和裂

解，以及适用于通过一起裂解该多个前体样本离子种类并且并行分析由此产生的多个碎片样本离子种类而进行的多个前体离子的并行分析（无论是在一个单一循环中被选择的，还是通过在多个连续循环中在例如辅助离子存储装置 60 中累积的）二者中。

[0065] 同样地，尽管对前体和碎片离子二者的质量分析达到高质量准确度是令人满意的，然而这可以在图 3 的示例性安排中在不同的地点并且以不同的方法实现。例如，可以通过将该质量从离子阱 30 喷射到静电阱 40 中，在静电阱 40 中分离前体离子并且将它们喷射到检测器 75 中，而不是将它们从离子阱 30 中传送到 Orbitrap 或其他质量分析器 70 中，从而在静电阱 40 中对存储在离子阱 30 中的前体离子进行质量分析。仅通过举例，检测器 75 可以是一个电子倍增器或者是具有单一的离子灵敏度并且可用于弱信号检测的一个微通道 / 微球板。可替代地，该检测器可以是一个收集器，并且因此可以测量很强的信号（有可能在一个峰中超过 10^4 个离子）。可以使用多于一个的检测器，其中调节器根据例如从以前获得的循环中得到的谱信息将离子束导向一个或另一个检测器。以这种方法，可以通过静电阱 40 获得来自前体样本离子种类的高质量准确度数据。此外，应当理解的是，检测方式也依赖于所使用的质量分析技术的性质。例如，如果正在进行飞行时间质量分析，那么典型地例如通过微通道板上顺序地检测出不断增加的 m/z 的离子。如果另一方面，正在进行 Orbitrap 或 FT-MS 分析，那么相反地可以进行基本上所有离子的同时检测（通过时域瞬变），随后进行一个后续的傅里叶变换转换为频域。由此进而可以确定离子的质量。因此应当理解的是，质量本身不需要通过离子检测被确定出；（飞行）时间、频率、电压、磁场以及其他的物理参数可以是初始被测量的量并且将那些初始测量参数转换为离子质量并非必不可少的。相反，绕开离子质量的计算并且在最初检测的量空间中直接进行一些随后的分析（下面将进一步说明）在计算上可能是有效的。因此，在下文中，尽管使用了术语“质量”（或质荷比），应当理解的是事实上可以仅对与离子质量相关的量，而不直接代表离子质量的量进行计算。不管怎样，许多质谱仪也检测离子的质荷比。存在不同的已知方法用于通过这个测定的 m/z 来确定分子质量（参见例如，US-A-5,072,115 以及 Hort 等人在 2000 年的 *J Am Soc Mass Spectrometry* (11 期) 第 320-332 页中)。以下说明的大多数计算最方便地在质量空间中进行，其中可能地已经将携带电荷的加合物进行修正。不管怎样必要的变换在本领域中是众所周知的和 / 或可以容易地确定。

[0066] 已经说明了从多个前体样本离子以及它们的碎片中获得质谱数据的一个示例性方法后，现在将说明实施本发明的一种方法，该方法涉及到对该数据进行并行处理（多路复用）从而允许几乎同时地识别多个前体样本离子（或其衍生物 / 母体）。

[0067] 首先将已经得到的复合的高质量准确度的碎片样本粒子质谱以及前体质谱两者都进行去电荷以及去同位素从而生成简化谱。然后扫描碎片质谱从而识别出其组合质量与这些前体离子种类中的一个的质量相匹配的碎片对。已经发现碎片离子的互补对在通过碰撞激活解离 (CAD) 生成的所有类型的碎片中具有独特的特异性，尽管可以同样地使用其他形式的裂解。

[0068] 尽管前体和碎片离子质量二者都测量达到高质量准确度，然而由于质量测量的有限准确度，它们将仍然具有一定程度的误差。这种测量误差可以用于报告处理碎片质量的信息：仅当两个碎片离子的结合质量与这些前体中的一个的质量在一个预定的误差

界限内相同（或者由于 H_2O 等的中性丢失，与一个前体的固定的预定偏差相同）时，才可以识别一个匹配。

[0069] 已经将碎片离子与前体离子种类匹配成对后，将该（复合的）碎片离子谱分解成多个部分，每个碎片对一个部分，并且仅包含每个碎片对。对复合的碎片质谱继续进行分析直到在规定的准确度限度内不能识别出另外的对。可以丢弃遗留的未被指定给一个前体离子种类的任何单一的碎片离子，或者将其包括在后续的认识分析（以下描述）中但是忽略它们。

[0070] 一旦已经完成了复合的碎片谱分析，对于将已经连接到一个特定的前体样本离子种类的所有碎片离子对通过将该复合碎片谱的每个单一的分解部分整合在一起或者另外地将其链接起来对应地对每个前体样本离子重构一个（简化的）碎片离子谱。换言之，对于被一起分析的“n”种前体样本离子（其具有通过裂解那些“n”种前体离子种类（或者同时地，或者顺序地但是所有碎片一起分析）而得到的复合的碎片样本离子质谱），将从上述分析产生“n”种单独的简化的碎片质谱（仅包含来自与该“n”种前体中特定的一个具有相同组合质量的碎片对的数据）。

[0071] 然后将这些得到的去卷积的碎片离子谱连同相关联的前体样本离子种类的测定的质荷比被一个接一个地发送到一种搜索引擎，如 Mascott™ 或 Sequest™。该搜索引擎对每个合成的碎片谱进行一次标准的数据库搜索，并且对每个这样的去卷积（合成的）碎片离子质谱返回可能候选者的一个计分的（并且可任选地，按分数分类的）列表。尽管单独地基于合成的碎片质谱的质量识别前体离子是目前优选的，然而可任选地，也可以使用每个的（相对）丰富度来辅助进一步的识别。

[0072] 这种技术去卷积了多路复用过程，但却保留了由这种多路复用过程所获得的所有速度优势：在 Masselson 和 Smith 的现有技术中，事实上当在前体质谱中准确地识别了前体离子时得到了最准确的结果，而要做到这一点，以高质量分辨率对前体离子进行分析是可取的（并且为了使现有技术方法能够工作，如已经讨论的，碎片离子的最高的质量准确度也是必须的）。换言之，本发明的实施方案相对 Masselson 和 Smith 的方法没有引入任何额外的时间罚分，并且提供了比非多路复用的 MS/MS 技术的显著的时间优势。此外，本发明的实施方案相对非多路复用的技术没有导致结果的准确度显著降低。然而，与 Masselson 和 Smith 的多路复用技术相反，当多路复用的前体的数目增加到 2 以上时，在现在说明的方法中碎片谱的识别准确度没有严重降低。

[0073] 为了进一步说明上述原理，并且具体而言是将多个碎片离子质量与一个前体离子质量进行匹配的方法，图 7 展示了分子对于 $C_{22}H_{42}N_9O_6$ 以及它的多个碎片的质谱的一部分。根据上述技术，首先将前体离子种类 ($C_{22}H_{42}N_9O_6$) 进行加合物修正（加合物是 H^+ ，具有（已知的）质量为 1.007825amu）。因此前体的经加合物修正的质量 p 是 $528.32526 - 1.007825 = 527.317984amu$ 。

[0074] 接着，选出一个第一碎片峰（图 7 中识别为 $B_1[R]$ ），并且将它测量的质量再次进行加合物修正。存储该（修正的）质量 M_1 （在图 7 中，指示为 $157.10839 - 1.007825 = 156.101114$ ）。接下来搜索所有其他的峰检测质量 M_2 ，在加合物修正下，其具有质量 $M_2 (= M_2' - 1.007825)$ ，从而 $M_1 + M_2 = p$ 。一旦识别出 M_2 ，将 M_1 置于一个已验证碎片质量的列表中。对于其他碎片离子重复该过程。表格 1 和 2 对应地展示了对于碎片离

子 [P]、[R]、[RK]、[QP]、[RKQ] 和 [KQP] 的未修正的以及经加合物修正的结果（在图 7 中展示了每个碎片离子的分子结构，但是为简洁起见，在此省略）。将会看到的是，在每个情况下，当进行加合物修正时，这些对的经加合物修正的碎片离子质量总计达到前体离子的质量。

[0075] 一旦已经编译了已验证的碎片质量的列表，如前所述的，例如通过一种搜索引擎，可以将它提交（连同前体离子质量的详细资料）用于进一步的分析。

[0076]

碎片名称 1	碎片 1 的质量	碎片名称 2	碎片 2 的质量	母体名称	母体质量
[R]	157.10839	[KQP]	372.22415	[RKQP]	528.32526
[RK]	285.20335	[QP]	244.12918	[RKQP]	528.32526
[RKQ]	413.26193	[P]	116.07061	[RKQP]	528.32526

[0077] 表 1- 未修正的母体以及碎片离子质量

[0078]

碎片名称 1	碎片 1 的质量	碎片名称 2	碎片 2 的质量	母体名称	母体质量
[R]	156.101114	[KQP]	371.216874	[RKQP]	527.31799
[RK]	284.196074	[QP]	243.121904	[RKQP]	527.31799
[RKQ]	412.254654	[P]	115.063334	[RKQP]	527.31799

[0079] 表 2- 经加合物修正的母体以及碎片离子质量

[0080] 图 4 展示了用于实施本发明的优选实施方案的一个优选质谱仪安排的功能性示意图。在图 4 中，可任选的样本制备首先发生在样本制备器 5 中。然后在阶段 15 进行色谱（并且具体而言是液相色谱 LC）发生中，并且将得到的分子在离子源 20 中电离。然后在一个离子选择器 25 中从这些中选出一个第一离子组。在选择后，将离子在一个碰撞单元 50 中裂解，并且然后在其下游在一个离子收集器 35 中进行收集。

[0081] 在离子选择器 25 中的选择过程、在碰撞单元 50 中的裂解过程以及在离子收集器 35 中的收集过程重复进行直到在离子收集器 35 中出现希望的离子组合。在此之后，将离子喷射到一个质量分析器 45（其可以是，例如，一个 OrbitrapTM 质量分析器）中，并且在一个数据处理系统 55 中处理质量分析器 45 的输出。在数据处理系统 55 中执行这些步骤是如上所概述的，并且包括将碎片离子去卷积从而分离对于对应的母体离子的数据集，连同可任选的数据库搜索或测序。

[0082] 可任选的来自数据处理系统 55 的反馈可以用于进一步控制离子选择和裂解过程。

[0083] 应当理解的是，图 4 的安排旨在是用于实现本发明的实施方案的一个质谱仪系统的多个优选部件的一种功能性表示。在一个单一的硬件元件上可以执行不同的操作阶段，因此，例如，选择步骤、裂解步骤以及收集步骤可以都可以在一个单一的离子阱（如一个 LTQ 傅里叶变换离子回旋共振（LTQ FTICR）质谱仪的线性阱四级（“LTQ”）线性离子阱）中执行，其中只有准确的质量分析在一个单独的质量分析装置中进行。理

论上地，甚至可以在同一个离子阱中进行质量分析 - 参见，例如 US-A-4,755,670。

[0084] 同样，应当理解的是，对多个离子的选择不需要是连续的。一个适当的波形（如，例如在 US-A-4,761,545 中所描述的）可以用于在一个离子阱中同时地选择所有想要的离子。对于滤质器存在相似的概念。

[0085] 现在转到图 5，它展示了一种可替代的质谱仪安排的一种功能性示意图，并且它适合于实施本发明的优选实施方案。与图 4 中的安排一样，可以通过可任选的样本制备装置 5 提供样本分子，该样本制备装置连接到一个液相色谱安排 15 上，该液相色谱安排向离子源 20 供应样本分子。

[0086] 如在图 5 中可见，离子源 20 将多个离子提供给一个质量选择四极 Q27：从那里，选择的离子传送到一个碰撞单元 q 50，并且从那里到达一个四极离子收集器 Q 29。四极离子收集器 29 的下游是一个可任选的连接到数据处理系统 55 的飞行时间质量分离器 47。

[0087] 在图 5 的安排的典型运转中，或者通过质量选择四极 27 的扫描，或者通过在四极离子收集器 29 中收集离子，随后在一个检测器上进行质量选择性扫描，或者通过收集四极离子收集器 29 中的离子，随后在飞行时间分析器 47 中进行质量分析来获得一个“标准”质谱。

[0088] 可任选地，关于用作分析的下述质量步骤的决定基于以前获得的谱，尽管当最终目标是使所有的离子都被裂解时，这个步骤当然是不必要的。

[0089] 接下来，操作质量选择四极 Q 27 以便一个接一个地选择想要的前体质量或质量范围。然后，将穿过质量选择四极 Q 27 的离子在碰撞单元 q 50 中裂解，并且将得到的碎片或者直接收集在该碰撞单元 q 50 中（因此免除了对后续的四极离子收集器 29 的需求），或者收集在该四极离子收集器 29 中。

[0090] 将得到的碎片在飞行时间分析器 47 中进行质量分析。然后，将如以前所说明的并且与本发明的多个实施方案一致的数据处理用于获得的质量信息中。

[0091] 图 6 再次功能性示意性地，展示了适合于实现本发明的多个实施方案的一种质谱仪的又一种安排。在图 6 中，再一次地，可以实施可任选的样本制备以及液相色谱步骤，从而向离子源 20 提供多个样本分子。然后，将来自离子源 20 的离子引导到一个线性离子阱 26 中。该线性离子阱的下游是一个离子收集器 31，它可与一个离子裂解装置 50'（可以是一个碰撞单元）相连接，并且，也可以单独地，与一个 Orbitrap™ 捕获质量分析器 70 相连接。将该 Orbitrap™ 质量分析器 70 连接到数据处理系统 55 上。

[0092] 图 6 的安排提供了多种操作模式。在一个第一模式中，在一次标准的质量扫描之后，在线性离子阱 26 中选择并且裂解一个前体离子。然后，将得到的碎片发送到中间体离子库 31 中。以相同的方法处理接下来的前体离子，并且注入到中间体离子库 31 中，从而与以前存储的碎片离子存储在一起。一旦已经将来自不同前体离子的所有想要的碎片都收集在该中间体离子阱 31 中，将它们一起发送给 Orbitrap™ 轨道捕获质量分析器 70 从而用于质量分析和检测。根据以前所说明的原理，在数据处理系统 55 上进行处理。

[0093] 在图 6 的安排的一种替代的操作模式中，例如，在线性离子阱 26 中利用一个存储的波形逆傅里叶变换 (SWIFT) 激发一些其他形式的“凹齿状”波形而同时选择多个前体离子。然后，或者在线性离子阱 26 中（例如通过碰撞诱导解离 (CID) 或电子转移

解离 (ETD)), 或者在一个单独的裂解装置 50' 中, (其中可以发生高能量碰撞激活解离 (HCD), 通过中间体离子阱 31 进入该裂解装置 50'), 将这些离子一同裂解。然后, 将这些碎片从离子裂解装置 50' 中送回, 并且收集在中间体离子库 31 中。在此之后, 可以将它们注入 Orbitrap™ 70 中以用于分析。

[0094] 在图 6 的安排的又一种操作模式中, 可以将如上说明的该第一和第二模式结合起来。例如, 可以分离一种质量范围或者可以分离并且增加不同的质量范围。

[0095] 在图 6 的安排的又一种操作模式中, 可以在线性离子阱 26 中进行连续的前体离子选择, 其中转移到中间体离子库 31 中, 随后在离子裂解装置 50' 中一同裂解所有的离子。然后, 再次将得到的碎片离子收集在中间体离子库 31 中, 并且在 Orbitrap™ 70 中进行质量分析。

[0096] 当然, 在每个情况下, 一旦已经获得了质量数据, 可以根据以前说明的实施本发明的原理使用数据处理系统 55 来处理质量数据。

[0097] 使用实施本发明的方法来获得来自 MS/MS 实验的实际数据。前体和碎片谱都是使用一个 FT-ICR 质量分析器并且具有半峰全宽 (FWHM) 为 100,000 的质量分辨率以高质量准确度 (在 1Sigma 下 2ppm 质量准确度) 获得的。使用 Mascot 搜索系统以阈值为 5ppm (3Sigma) 和 10ppm (6Sigma) 进行形成本方法后面阶段的数据库搜索。

[0098] 图 8 示出了平均 Mascot 分数的绘图, 为使用这样得到的数据并且应用本发明的方法已经多路复用在一起的前体离子和它们的碎片谱的数目的函数。为用于比较, 示出了使用现有技术的 Masselson 和 Smith 技术 (事实上他们使用了 Sequest 系统, 该系统与 Mascot 系统相似, 用于数据库搜索的目的) 得到的平均 Mascot 分数。

[0099] 这两种方法都随着多重峰的数目逐渐增加生成逐渐减少的分数, 但是对于现有技术方法来说, 即使仅有两个多重峰, 预测的分数 (使用 Mascot) 也显著地下降。大约 30 的分数通常被认为是可接受的。从图 8 中可以看出, 与现有技术方法相比, 对相同的可接受分数, 本发明的实施方案的方法能够使得更多的前体离子种类被多路复用。这导致了通量上相当大的提高。它也可以意味着对于在从色谱分离 (它通常在质谱之前) 可得到的时间窗内的样本能够得到远远更多的有用的信息。

[0100] 为了使用一种高质量准确度的光谱学技术 (如 FT-ICR-MS 或 OrbitrapMS, 它们需要每次光谱捕获约 0.5 秒) 从 4 个前体离子种类中得到 MS/MS 数据, 单独地选择、裂解以及进行质量分析花费的时间为 2.5 秒, 其由一个前体离子谱和 4 个碎片谱所构成。使用本发明的时间仅为 1 秒, 其由 1 个前体离子谱和 1 个碎片离子谱所构成。使 Mascot 预测分数很好地保持在可接受水平 30 以上, 实现了 2.5 因子的时间减少。

[0101] 与图 8 相关联如上所指出的, 本发明的方法确实随着多路复用的前体离子种类数目的增加减少了 Mascot 分数, 但是这种减少是不剧烈的。为了进一步说明这一点, 已经与非多路复用的结果进行了直接比较。从 CAD MS/MS 谱的数据库中选出一千个质谱。将具有四个图谱的多个组叠加在一起以便模拟如果将四个前体离子种类裂解并且将这些碎片组合并且一同进行质量分析的每个情况中应当获得的多路复用的碎片离子光谱。这导致了 250 个模拟的多路复用 MS/MS 谱。然后紧接着进行本发明的处理方法, 并且将这些结果与没有多路复用得到的结果进行比较。

[0102] 按照如上所述的实施本发明的方法, 将每个模拟的多路复用的碎片质谱进行去

同位素、去电荷、并且转换为一列中性碎片质量。对于这四个前体质量 M_m 中的每一个，选出碎片质量的 m_i 和 m_j 对，从而在质量的不确定度为 $\pm 15\text{mDa}$ 下以使 $m_i+m_j = M_m$ ，该不确定度与初始谱的质量准确度有关。因而将每个模拟的多路复用质谱分成四个去卷积的 MS/MS 谱。

[0103] 将初始的 1000 个 MS/MS 谱提交给 Mascot，这导致了 980 个阈值以上的肽识别。剩下的 20 个质谱 (0.2%) 未被识别主要是因为将已识别的谱放入 MS/MS 数据库之后，蛋白质数据库已经改变。在图 9 中通过黑色柱展示了 Mascot 分数的分布。将 1000 个去卷积的质谱也提交给 Mascot。总计识别出 899 个肽 (91%)。在图 9 中通过灰色柱展示了得到的 Mascot 分数的分布。899 个序列中仅有 2 个去卷积的肽与标准识别序列不相符合，对应于 0.22% 的假阳性率。

[0104] 基于在一个 Orbitrap 质量分析器中使用 CAD 来裂解前体离子以及检测离子，相对于一个非多路复用的 MS/MS 实验估算通量的提高是可能的。如果进行无碎片检测的 CAD 花费 1 个时间单位，并且 Orbitrap 检测花费 4 个时间单位，那么在“标准”（非多路复用）模式下，8 个循环中的 1 个所花费的总时间为 $1 \times 4(\text{MS})$ 加上 $8 \times 4(\text{MS/MS}) = 36$ 个时间单位。在多路复用模式下，所花费的时间为 $1 \times 4(\text{MS})$ 加上 $2 \times 4(\text{MS/MS}) = 12$ 个时间单位。因此，相对于非多路复用技术，有一个近似三倍的通量的提高，其中将在样本离子种类的识别的准确度上的减少降到最低。

[0105] 设想了对上述技术的不同修改、替代和增加。例如，为了进一步辅助将碎片离子种类对与它们的前体相匹配的过程，也可以使用下面的方法。

[0106] (1) 在将前体和碎片离子谱去同位素之前，可以指出同位素峰的精细结构，例如存在 ^{13}C 或 ^{32}S 。在前体种类中的这些同位素也将会在它们相应的碎片中被观察到。这能够用于确认或反证多个指定，或者帮助识别不能仅靠加入碎片对来识别的前体-碎片关系。

[0107] (2) 当它们的质量仅适合前体中的一个时，例如，当碎片太大而不能来自于一个较低质量的前体时，直接将多个碎片指定给某些前体。

[0108] (3) 使用准确的质量信息，可任选地与物质类别信息（例如，该样本是一种肽的知识）一起，从而排除/包含某些碎片。仅通过一些碎片的准确的质量、前体的准确质量以及中性丢失的可能选择，它们只能够来自某一个前体。

[0109] (4) 当进行样本分析时，执行去卷积。通过第二次包括未分辨出的前体离子种类，可以在相同的样本的下一个循环的分析中识别并分辨可能的干扰。这种随后的循环将产生出不同的多路复用碎片谱，因为除一个外全部的前体离子种类都是不同的。可以在这种数据集合或者在这种集合与以前集合的一个组合上尝试识别以前未分辨出的前体离子种类的碎片。

[0110] 前文中描述了用于在 MS/MS 实验中对前体和碎片离子进行多路复用分析的技术。然而，应当理解的是，本发明不限于单级的裂解。具体而言，上述方法同样适用于 MS^3 或者甚至是 MS^n 实验。

[0111] 图 10 展示了说明如何实现 MS^3 ，并且具体而言，说明了本发明的实施方案的方法如何可以应用到第一和第二代（“孙碎片”）碎片离子二者中的一个流程图。在步骤 100，与图 3 相关如以前所述的，获得达到高准确度的一个前体质谱，如是 MS/MS。

在步骤 200, 或者通过在静电阱 40 中分离不同的前体离子种类的多次循环, 或者可替代地通过在静电阱 40 中选择多个前体离子种类的更窄的“窗口”来将感兴趣的前体离子种类累积在一起。然后, 将这些累积的前体离子种类在裂解装置 50 中同时裂解(步骤 300), 并且将来自多个离子光标离子种类的多个碎片离子种类在辅助离子存储装置 60 中累积在一起(步骤 400)。作为在一同裂解之前, 将所有感兴趣的前体离子种类累积到一起的一种替代方案, 相反地, 可以将前体离子种类一次一个地分离、分别裂解, 但是再次如前所述, 仍然将来自每个前体离子的碎片离子累积在一起。

[0112] 接下来, 在步骤 500, 通过质量分析器 70 得到碎片的质谱, 达到高质量准确度。如下所述, 在步骤 600 和 700 中将得到的碎片质谱发送用于处理。

[0113] 接下来, 在一个第一回路中, 将又一个集合的前体离子进行累积(再次步骤 200)。将这些前体离子同时裂解(步骤 300)从而形成第一代碎片离子的一个累积集合, 这些第一代碎片离子存储在辅助离子存储装置 60 中(再次步骤 400)。然而, 这次, 不是获得这些碎片的一个质谱, 而是将它们从辅助离子存储装置 60 返回到裂解装置 50 中, 在那里将它们再次裂解。在图 10 中这显示为步骤 800。然后, 通过将得到的第二代碎片离子(孙碎片)(在步骤 900 中)通过离子阱 30 发送到质量分析器 70 中对其进行质量分析。

[0114] 将上述实施本发明的方法应用到步骤 500 中得到的第一代质谱上, 从而将碎片离子指定到前体离子种类上(步骤 600)。在步骤 700 中对这些指定的结果进行存储。同样地, 使用本发明实施方案的技术对第二代(孙级)碎片离子的质谱进行分析, 从而将第二代碎片离子指定给第一代碎片离子种类。此过程被展示在步骤 1000 中。再次将该分析的结果存储在步骤 700 中。

[0115] 将本发明的技术应用到多级质谱(MS^n)提供了相对现有技术的有可能非常显著地时间节省。获得一个前体离子谱的步骤 100 中耗时约 0.5 秒。获得第一代碎片离子的质谱(步骤 500)同样耗时 0.5 秒, 并且当使用 MS^3 时, 完全省掉这个步骤甚至可以是可能的。最后, 步骤 900 中的第二代碎片离子的质谱耗时大约 0.5 秒。

[0116] 因此, 在最坏情况下, 总的的数据收集时间是 1.5 秒。现有技术耗时至少 10.5 秒, 因为 4 个单独的碎片离子谱耗时近似 2 秒来得到, 并且 16 个后续的第二代碎片谱总共耗时 8 秒。

[0117] 清楚地, 因为可以获得下一代的碎片, 这种技术变得更加复杂, 但是, 同样地, 时间的节省变得更多。 MS^3 实验的目的之一是明确中性碎片, 如水、铵、磷酸化或其他的侧链损失, 以及来自糖肽类的糖类损失。

[0118] 此外, 尽管前文中描述了对通过 CAD 生成的碎片离子的分析, 应当理解的是, 这些技术同样适用于许多其他形式的离子裂解, 例如(但不限于)ECD、ETD、亚稳离子轰击、CID(阱 CID 和 HCD 二者)、以及例如 IRMPD。确实地, 作为上述方法的另一种变化, 并且为了生成进一步的信息, 可以重复前体离子种类的分离以及随后的裂解, 但是其中对相同的前体离子种类改变裂解方法和/或裂解能量。这种技术允许对碎片的所谓的“黄金对”进行潜在的认识, 其中不同的裂解技术产生不同的分裂机制, 这些机制或多或少是被理解的。例如, 通过碰撞诱导解离(CID)产生的一个 B2 碎片可以与 ETD 中的一个相应的 C2 碎片相匹配, 其中一个固定的质量差 17.0265 是氨(NH_3)的质量。

[0119] 本发明的方法可以应用于多种聚合物以及生物聚合物（如蛋白类、多肽类、DNA/RNA、脂类以及它们的修饰物）的分析。

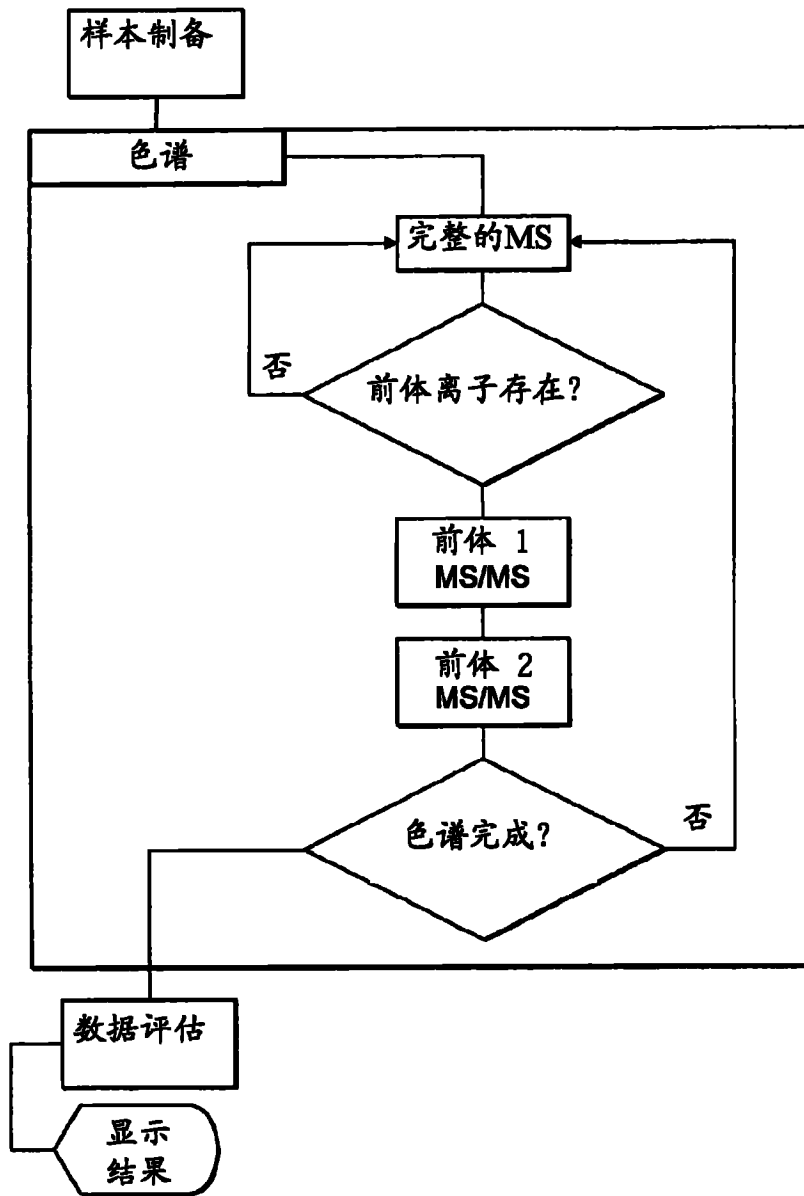


图 1 现有技术

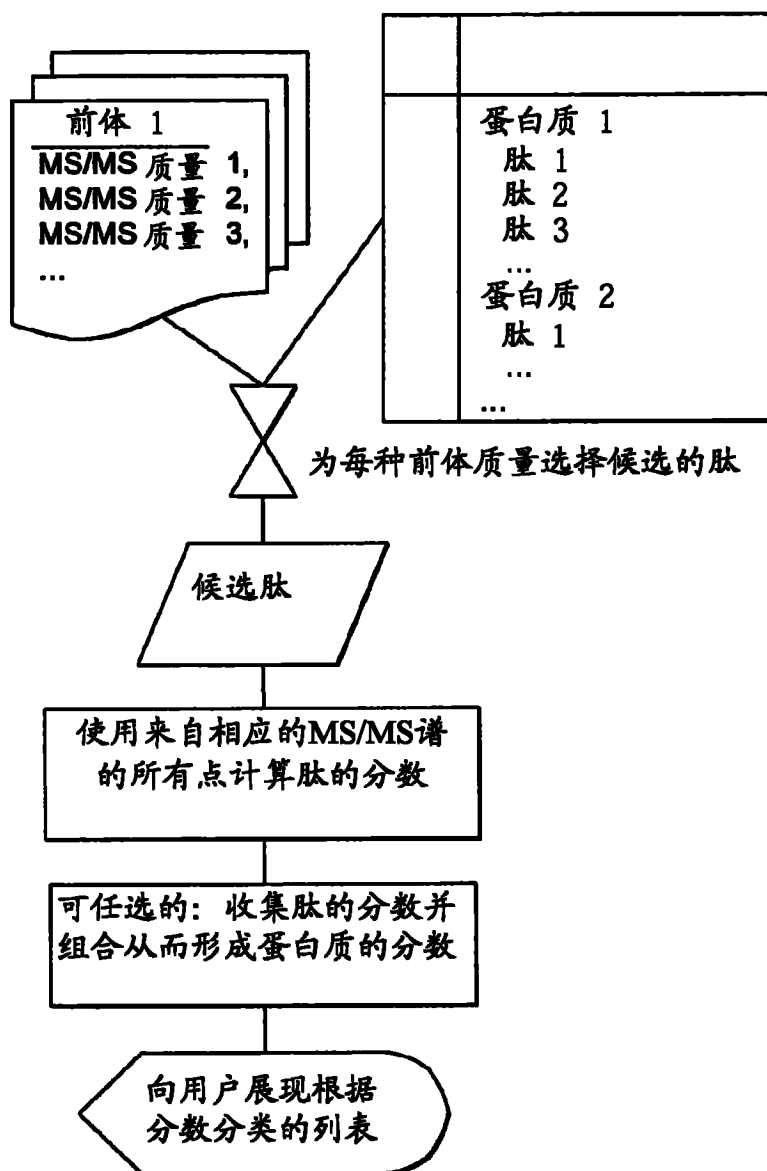


图 2 现有技术

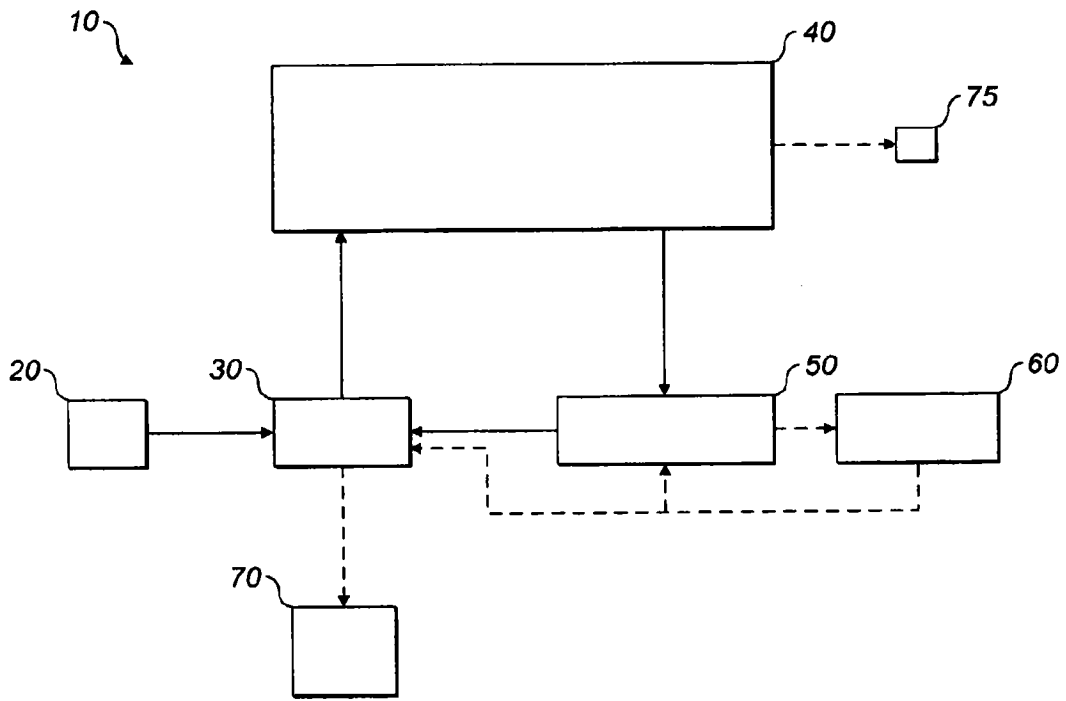


图 3

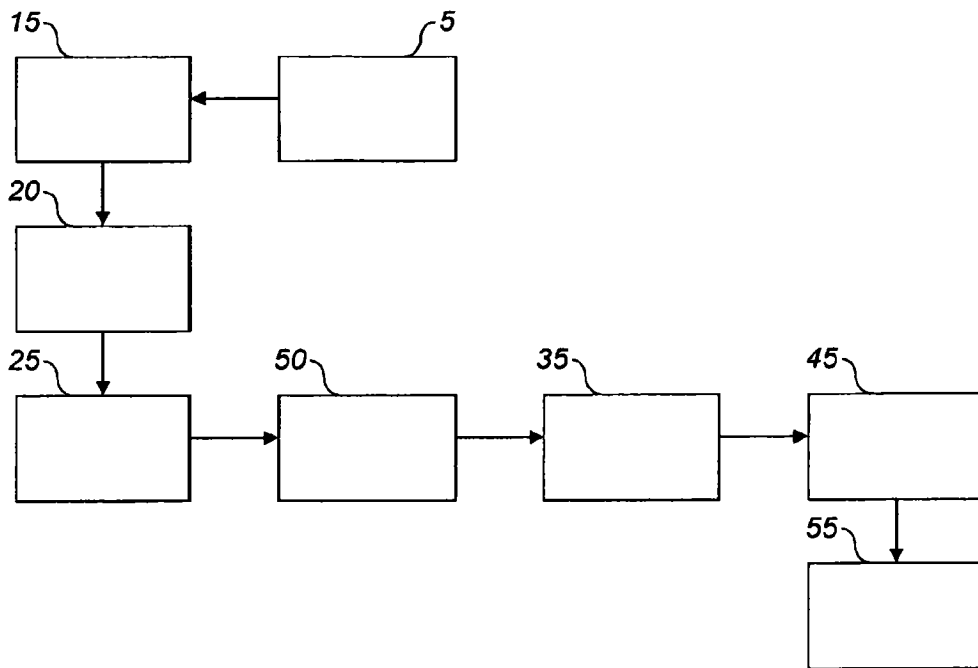


图 4

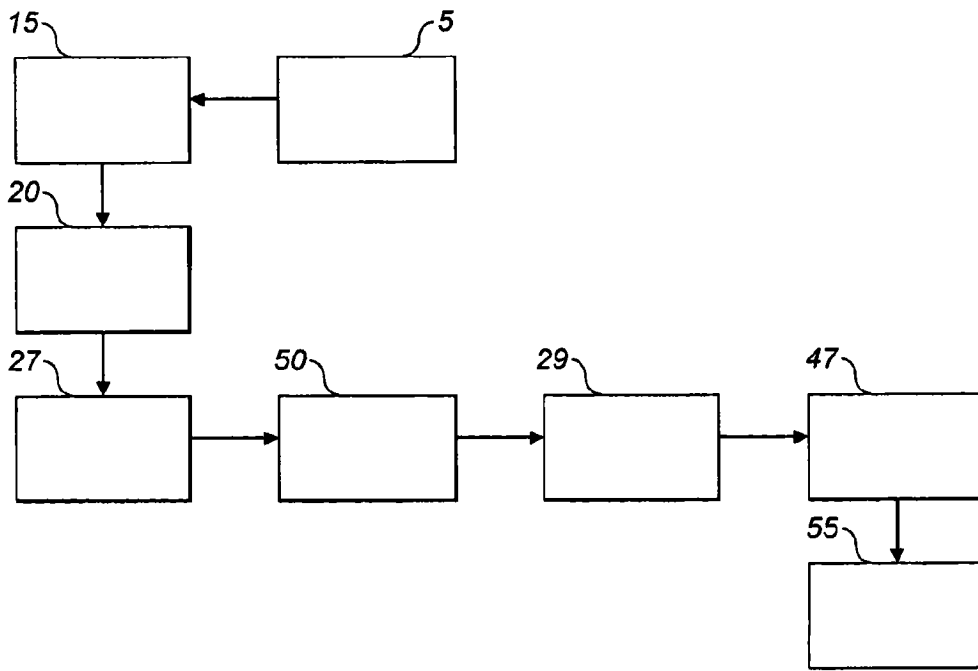


图 5

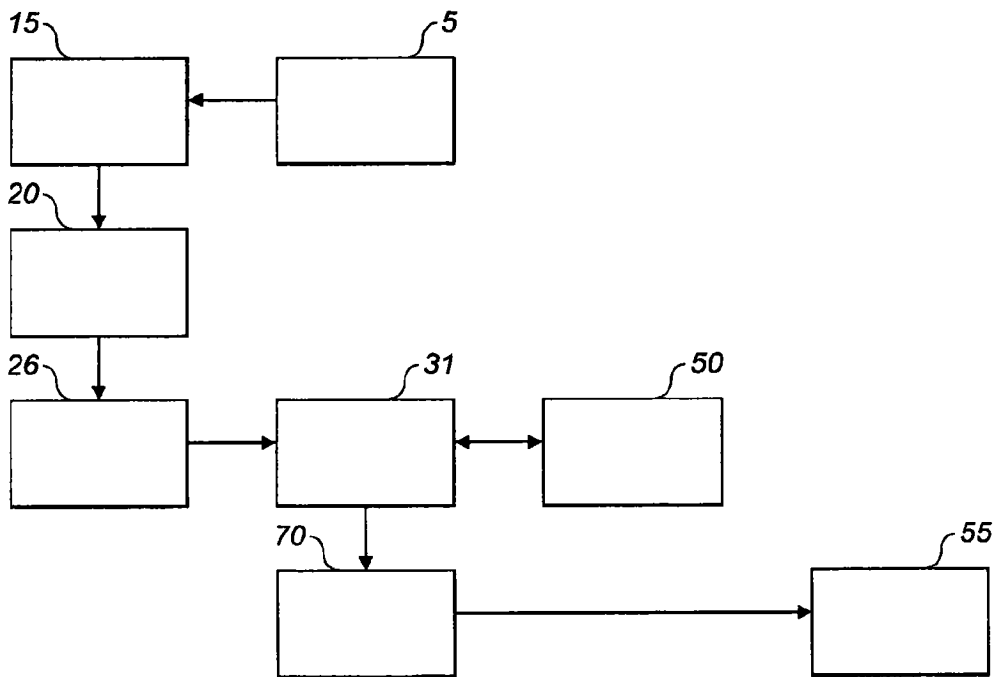


图 6

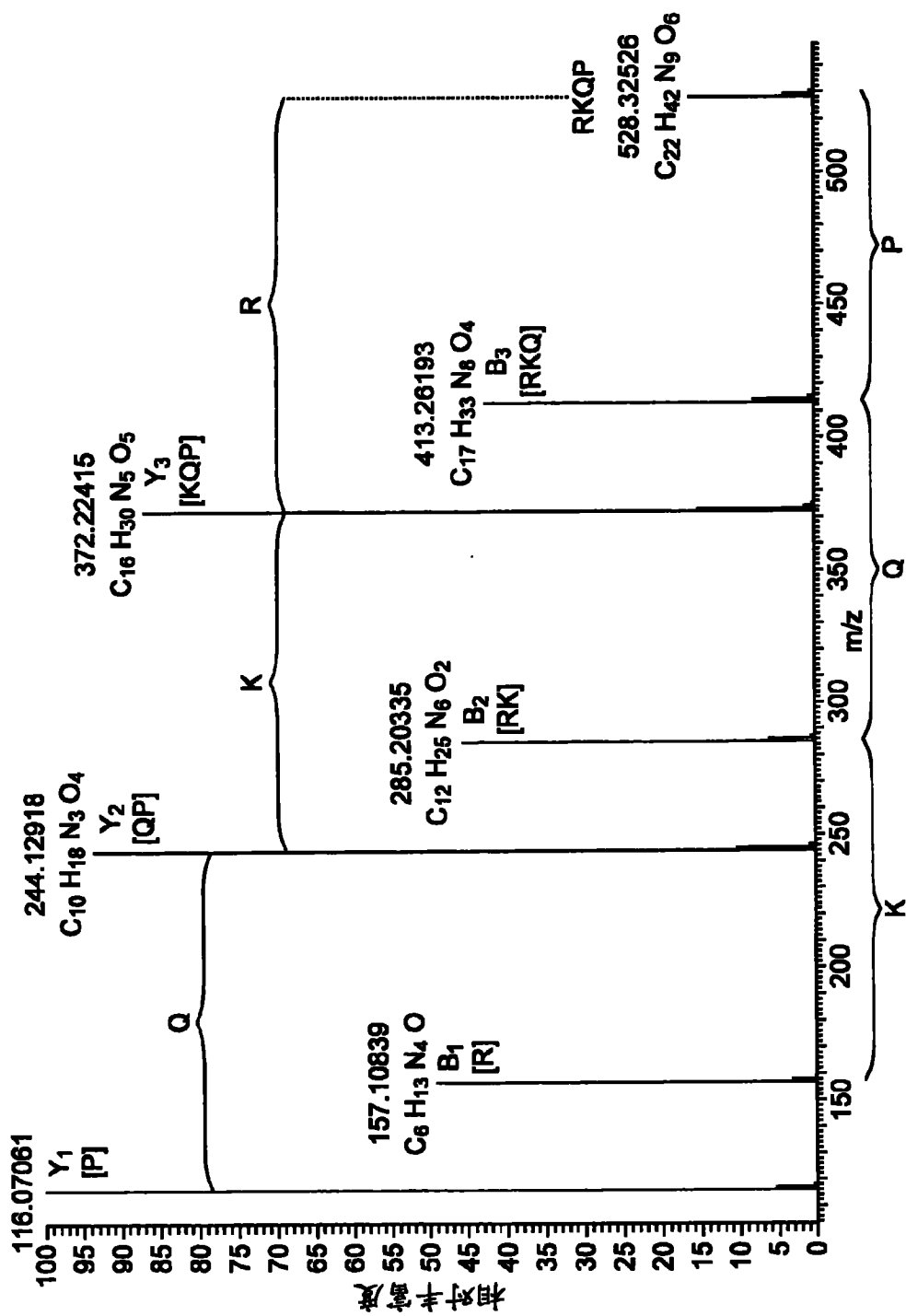


图 7

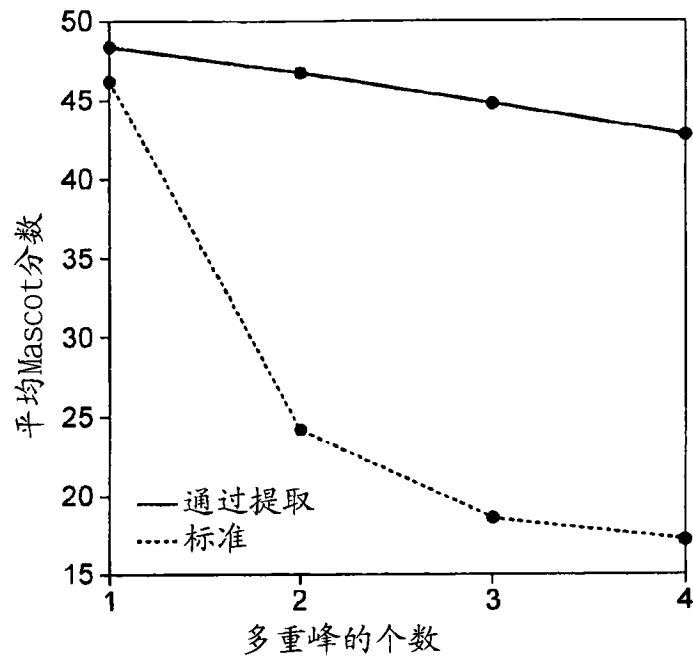


图 8

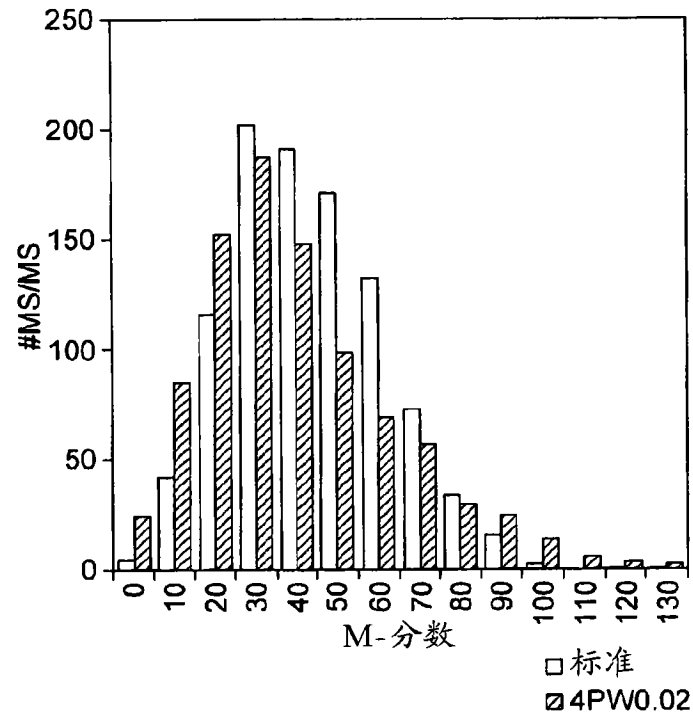


图 9

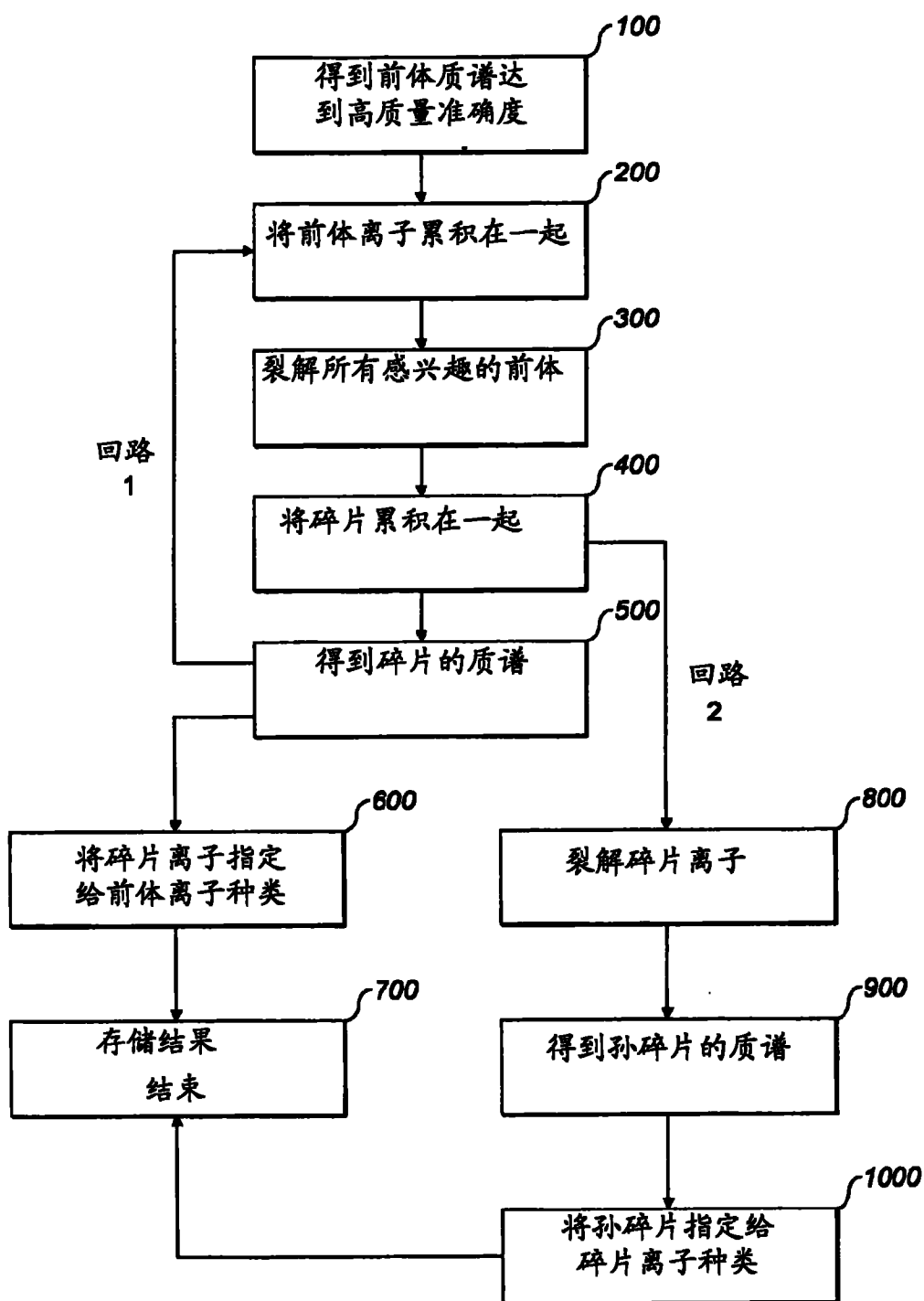


图 10