

以呼吸中揮發性有機物作為台灣地區肺癌指標之相關性研究
A study of volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer in Taiwan.

計畫編號：NSC91-2320-B-040-042

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

主持人：張耀仁 中山醫學大學毒理所

共同主持人：吳銘芳 中山醫學大學附設醫院 腫瘤內科

計畫參與人員：吳雅雪，王建良 中山醫學大學毒理所

1. 摘要

肺癌是目前世界死亡率最高的癌症，由於肺部癌化細胞在發生初期病理症狀相當輕微，因此不容易早期發現。然而假如可以早期發現肺癌並得到良好的治療，五年的存活率很明顯的有大幅的提昇，因此研究便指向尋找早期偵測肺癌的方法，建立肺癌早期篩檢試驗。然而，目前的肺癌診斷技術並不足以作為早期篩檢，需要更好的方法來分辨細胞早期之病變，透視肺癌這個棘手的疾病。分析肺呼吸：呼入與呼出空氣中揮發性有機物(VOCs)，是很有用的研究工具，在臨床醫學上有極大應用潛力。近年來，在國外致力於肺癌病患肺呼吸中揮發性有機物的研究，找出與肺癌發生具高相關性的VOCs；由於肺呼吸檢驗有著簡單、安全、病患接受度高的優勢，因此開啟了肺癌早期偵測的新視窗。本研究以吸附劑採樣，以熱脫附系統加上的氣相層析/質譜儀(GC/MS)的方式來分析台灣肺癌患者肺呼吸中之VOCs，並與國外的研究比對，以建立國人肺癌患者之標記。有鑒於台灣肺癌亦是十分嚴重，加上在各方面的獨特性：有許多不抽煙的人得到肺癌，特別是女性；因此進行早期偵測肺癌的肺呼吸研究，建立國人肺呼吸之基本資料與台灣不抽煙肺癌患者之分析，有其必要性。

關鍵字：肺癌，揮發性有機物，熱脫附系統-氣相層析/質譜儀

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in the world. Because of the small cellular changes, it is not easy to detect lung cancer

at an early stage when it is probably localised. If, however, the lung cancer is localised at the time of diagnosis and treated promptly, 5-year survival increases obviously. This fact has stimulated the search for screening tests to detect lung cancer at an early stage when it is probably localised. Unfortunately, diagnostic techniques currently used in the lung cancer are not sufficient. A better method is needed to identify early cellular changes related to this terrible disease. Analysis of volatile organic compounds (VOCs) in inspired air and alveolar breath is a useful research tool with potential applications in clinical medicine. Recently, VOCs, principally alkanes and benzene derivatives, have been identified in breath from patients with lung cancer. Breath testing for VOCs is intrinsically safe and noninvasive, and might offer a new approach to the early diagnosis or evaluation of lung cancer. In this project, we have studied the variation in VOCs in the breath of normal humans and patients with and without lung cancer, using thermal desorption - gas chromatography-mass spectrometry (TD-GC-MS). We have investigated whether a combination of VOCs could identify such patients with and without smoking, especially women in Taiwan and establish the high probability volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer in Taiwan.

Keyword : Lung cancer, volatile organic compounds(VOCs), Thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry

2. 前言：

衛生署今年5月公布我國91年十大死因，惡性腫瘤連續21年居於首位，平均一天就有94人死於癌症，也就是說，每15分18秒就有一人因此死亡。其中，肺癌由於不易早期發現，為最難治愈

的癌症之一。近三十年來，台灣與歐美國家一樣，肺癌死亡率都有逐年顯著增加的現象。在 1982 年，台灣男性與女性每十萬人中就有 16.69 及 7.78 人是因肺癌而死亡，到了 2000 年，每十萬人之男性與女性，分別有 38.69 及 17.52 人是因肺癌而死亡(Department of healthy, ROC, 1984-2000)。由上述數據可得知肺癌目前已成為台灣民眾癌症死亡的重要死亡原因，然而在診斷方面仍不能有效地偵測肺癌，治療成果也難以突破，因此目前的策略將著重於深入探討肺癌的確切病因及發展早期偵測肺癌的方法。

抽菸是已知造成肺癌的最主要致病原因。抽菸所以致癌，主要原因是由於燃燒的香煙中含有致癌物質：多環芳香烴類化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 如：Benzo(a)pyrene (BaP) 等¹。Hall et al. (1990)² 研究指出多環芳香烴在生物體內，會經由微粒體單氧化酵素系統或前列腺素 H 合成酵素 (prostaglandin H synthase, PHS) 代謝活化成 epoxide，然後經水合作用轉變為 diols 型的活化最終代謝物，而與 DNA 共價結合形成 DNA 鏈結物。另外在最近的研究也指出二手菸與肺癌之形成有關，二手菸的成分大致和主動吸入之香菸成分相似，但因吸入時溫度較抽菸狀態為低，許多致癌物之濃度甚至比主動吸入之濃度還高，因此二手菸引起之細胞毒性及致突變性亦較主動吸入之香菸高³。除了吸煙及二手菸之外，其他如汽機車排放廢氣、廚房油煙、點燃拜香及蚊香所產生的煙霧等^{4,5} 皆是與肺癌有關的環境污染源。

目前肺癌的偵測方法主要有胸部 X 光、痰液細胞檢查、電腦斷層攝影、支氣管鏡檢、肺部超音波以及腫瘤標記。X 光片檢查是診斷肺癌最常用的方法，通常腫瘤需大於一公分才可由 X 光方法發現，但 X 光片上的異常狀況常難與其他肺部疾病做辨識，必需配合組織病理學或細胞學做進一步的證實，才能準確判斷，因此常會延誤診斷；痰液細胞檢查容易有假陽性及假陰性的問題；電腦斷層攝影則有假陽性與費用高的問題；支氣管鏡檢可直接看到病灶且可取得活體切片，對於診斷上很有幫助，但是在檢查時常造成病患的不適及有壓迫感，因此接受度不高；而生物腫瘤標記則有靈敏度上的限制。而上述的肺癌偵測方法對早期偵測肺癌仍無良好的對策。為了有效降低肺癌的死亡率，發展一種適當、準確並能早期篩檢肺癌的偵測方法是必要的。

已知某些疾病發生時會影響到體內超氧自由基 (oxygen free radical) 而引起脂質過氧化反應 (lipid peroxidation)，導致細胞膜上的多元不飽和脂肪酸轉變成一些具揮發性和特殊味道的物質，如 n-pentane、aldehydes、alkanes、formaldehyde 等^{6,7}。以上這些物質皆屬於揮發性有機物質 (Volatile organic compounds, VOCs)；體內產生的 VOCs 主

要由肺臟排出體外；由於不同疾病導致體內代謝能力不同，故產生的 VOCs 也不同。如 pentane 是 n-6 多元不飽和脂肪酸經過超氧自由基調控的脂質過氧化產物，乳癌⁸、急性心肌梗塞⁹、心臟移植排斥¹⁰、類風濕性關節炎¹¹ 及急性支氣管氣喘¹² 等疾病，其呼吸中的 pentane 濃度皆會增加。而 Alkanes 在體內的排除主要是藉著 cytochrome P450 mixed-oxidase enzyme 將其代謝為 alkyl alcohols¹³。

1971 年，Pauling¹⁴ 等人開始偵對正常人呼吸中的 VOCs 進行分析，實驗結果發現到許多以前未被偵測過的 VOCs。而目前已知呼吸中的 VOCs 約有 200 種，其濃度範圍在 pico molar (10^{-12} mol/L)¹⁵。1997 年 Michael Phillips 開始探討利用 VOCs 做為肺癌偵測 marker 的研究¹⁶；他使用特殊的肺呼吸收集器 (breath collecting apparatus) 採樣，以吸附劑 (Carbotrap) 提取 VOCs，再加上熱脫附系統濃縮 VOCs，最後以 GC/MS 進行分析。在 1999 年¹⁷，他利用上述系統分析了 108 位支氣管鏡檢和胸部 X 光檢查不正常且沒有肺癌病史的病患所呼出中的 VOCs，這些 VOCs 當中有 22 種，包括 alkanes、alkane 衍生物以及 Benzene 衍生物被當做為是否罹患肺癌的指標。由於台灣地區與歐美肺癌病人性本研究利用吸附性採樣管採集空氣及病人之 VOCs，接著利用 Thermal Desorber 熱脫附系統濃縮，最後以 GC/MS 進行分析，期望能針對台灣地區肺癌患者找到肺呼吸之生物代謝指標。

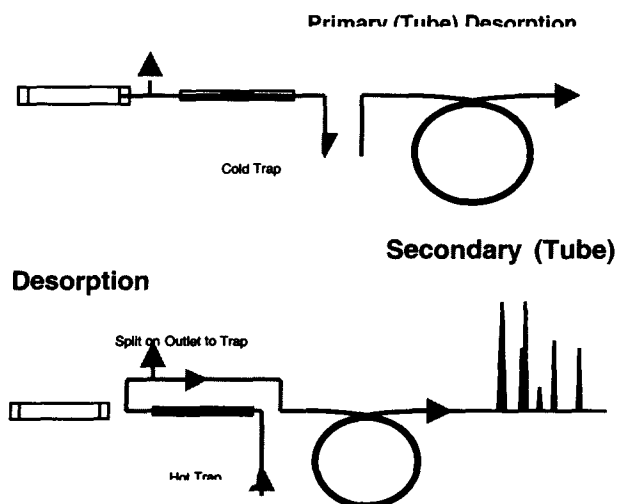
3. 實驗方法：

在本研究中使用 Tenax 吸附劑，Tenax 是種高分子聚合物的固體吸附劑，主要是針對 C5-C26 的化合物。吸附管為 7 cm，Column 為 Stabilwax column 或 Rtx^R-5MS column，分析了 14 位懷疑或確定罹患肺癌的病人與 10 位健康者，14 位病人中有 8 名男病患，平均年齡為 70.8 歲；6 名女病患，平均年齡為 68.3 歲。(病人呼氣分析是與中山醫學大學附設醫院，吳銘芳醫師合作)

本研究採用的分析方法是將吸附劑 (Tenax 500 mg) packing 於吸附管中，以此吸附性採樣管採集空氣 VOCs (背景值) 及病人呼出的 VOCs，採集時間為 3 min；採集完檢體後將吸附管放入夾鍊帶中，置於碎冰塊中，送至實驗室冰箱冷凍，等待分析。實驗利用 Thermal Desorber (AERO Trap 6000 Thermal Desorber) 熱脫附系統濃縮，搭配 GC/MS (HP 6890, mass selective detector-5973, Hewlett Packard) 進行定性分析。



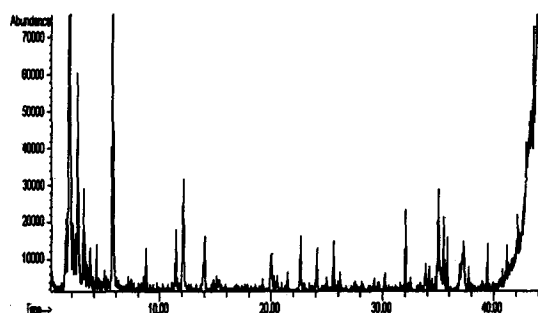
圖一、將吸附劑 packing 於不銹鋼吸附管中，兩端以纖維棉塞住



圖二、2-Stage Desorption Using a Small, Packed Trap

4. 結果與討論

人體呼吸出來的揮發性化合物其實是十分複雜，利用上述系統分析如圖三，可得到非常複雜的層析質譜圖，利用質譜的資料庫檢索，可大致鑑定利用上述系統分析了 14 位懷疑或確定罹患肺癌的病人，14 位懷疑或確定罹患肺癌的病人中有 4 個病人檢體是利用 Stabilwax column 分析，在 Michael Phillips 所提出的 22 種 compounds 中看到了 8 種：Benzene (3/4)、Benzene propyl (2/4)、Benzene 1,2,4-trimethyl (2/4)、Decane (3/4)、Undecane (2/4)、Benzene 1,4-dimethyl (3/4)、styrene (3/4)、Hexanal (3/4)。



圖三、肺癌病人呼吸中揮發性化合物之層析質譜圖。

而 14 位懷疑或確定罹患肺癌的病人中有 10 個病人檢體是利用 Rtx^R-5MS column 分析，在 Michael Phillips 所提出的 22 種 compounds 中看到了 9 種有變化：Benzene (8/10)、Benzene propyl (7/10)、

Benzene 1,2,4-trimethyl (6/10)、Decane (7/10)、Undecane (5/10)、Benzene 1,4-dimethyl (6/10)、styrene (7/10)、Benzene, [1-methylethyl] (4/10)。

Benzene
Benzene propyl
Benzene 1,2,4-trimethyl
Decane
Undecane
Benzene 1,4-dimethyl
styrene
Hexanal

表一、利用 Stabilwax column 分析得到 8 種 compounds

升溫程式由越低溫開始，可分析的 VOCs 越多，本研究目前最低溫只能到 25°C，因此損失一些訊息。由和 Michael Phillips 所提出的 22 種 compounds 比較，1-hexene、1-heptene、Hepatanal、Cyclohexane、Heptane,2,2,4,6,6,-Pentamethyl、Nonane,3-methyl、Cyclopentane-methyl、Octane,3-methyl、Methane,trichlorofluoro、Heptane,2,4-dimethyl、Cyclopropane,1-methyl-2-pentyl、Heptane, 2 -methyl、1,3-butadiene,2-methyl-(isoprene) 等 13 種化合物沒被偵測到，可能原因除了升溫程式還無法從低溫開始分析及使用不同吸附劑外，採樣時因顧及病人的病情，未採用閉氣呼吸採樣，造成靈敏度不佳為主因。

除了 Michael Phillips 所提出的 22 種 compounds 外，仍有許多 VOCs 化合物也重覆出現並有代謝上的變化，如 Benzene ethyl、Nonanal、Naphthalene、Tetradecane 等化合物；這些化合物也許也是有意義的肺癌 marker，但仍需要更多的證明。目前面臨的問題是：空氣採樣的背景值與病人檢體層析圖間還無適當程式可自動扣除，靠人工判別費時且無法得到量化的結果。

減少監測的揮發性有機氣體種類，是呼吸檢測未來是否實用的關鍵。2003 年 Matthew Giardina 及 Susan V. Olesik 在 Anal chem. 發表了一篇文章¹⁸，利用固相微萃取 (Solid-phase microextraction, SPME) 的方式來可分析揮發性有機氣體 (VOCs) (nanomolar concentration)。由於人體呼出的 VOCs 極為微量，故 M. Giardina 及 S.V. Olesik 利用 SPME，以 4-cm-long，低溫 glassy carbon (LTGC) macrofiber 來監測五種肺癌相關揮發性有機氣體 (styrene, propylbenzene, decane, undecane, 2-methylheptane)，最後利用 GC/MS 分析。由結果看到 conventional SPME 與 SPME

macrofiber 比較，conventional SPME 的偵測極限降低了，可達到 sub-picomolar，更適合去分析人類呼出的揮發性有機氣體 (VOCs)。而 LTGC SPME macrofiber 與 PDMS/DVB 比較，發現 LTGC SPME macrofiber 具有更高的靈敏度、peak 鑑定更準確、萃取效力更好等優點。因此本實驗的採檢方式可改良為閉氣採樣外，並且只偵對幾種肺癌相關揮發性有機氣體進行分析，期許能利用本實驗逐漸建構的系統探討正常人及肺癌病人間 VOC 的差異，未來可利用此 VOC 的差異當作為是否有罹患肺癌的指標。

Benzene
Benzene propyl
Benzene 1,2,4-trimethyl
Decane
Undecane
Benzene 1,4-dimethyl
Styrene
Hexanal
Benzene, [1-methylethyl]

表二、利用 Rtx^R-5MS column 分析得到 9 種 compounds

5. 結論

肺癌是目前全世界癌症發生率與死亡率最高的病症之一，在台灣也有極特殊的現象：有許多不抽煙的人會得到肺癌，特別是女性。由於肺部癌化細胞在初、中期之病理症狀相當輕微，在目前的診斷技術仍無法有效的進行早期篩檢。利用肺呼吸氣體之分析：分析呼入與呼出空氣中揮發性有機物 (VOCs) 的差異，來早期診斷肺癌，在臨床醫學上有極大應用潛力；目前更有呼氣分析推廣到乳癌病人的之報導¹⁹。本研究首先以特殊之吸附性採樣管採集空氣及病人之 VOCs，接著利用熱脫附低溫冷凝系統濃縮，結合氣相層析質譜儀 (GC/MS) 的方式來進行偵測。研究分析正常人與肺癌患者肺呼吸中之揮發性有機物 (VOCs) 之差異，與國外肺癌病患肺呼吸研究進行比較有九種相同，在簡化模型則有四種相同。由於肺呼吸檢驗有著簡單、安全、病患接受度高的優勢，因此建立國人肺癌患者之 VOCs 標記，有極大的需要與待努力的空間。

參考文獻

[1] M., Pozzoli, L. and Levis, A. G. Mutagenic activity and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in urine of workers exposed to coal tar pitch volatiles in an anode plant. *Carcinogenesis* 1985; 6:749-752.
 [2] Hall M, Parker DK, Grover PL, Lu JY, Hopkins NE, and Alworth WL. Effects of 1-ethylnylpyrene and related inhibitors of P450 isozymes upon benzo[a]pyrene

metabolism by liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*, 76(2):181-92, 1990
 [3] Adlkofer F. Lung cancer due to passive smoking. *Int Arch Occup Environ Health*, 74:231-241, 2001
 [4] Lee H, Yur JH, Shioh SJ, and Lin JY. The mutagenic activity of smog airborne particles collected during combustion products. *J. Chin. Oncol. Soc*, 4: 1-8, 1988.
 [5] Lofroth G, Stensman C, and Brandhorst-Satzkorn M. Indoor sources of mutagenic aerosol particulate matter: smoking, cooking and increase burning. *Mutation Res*, 261(1):21-8, 1991
 [6] Kneepkens CMF, Ferreira C, Lepage G, Roy CC. The hydrocarbon breath test in the study of lipid peroxidation: principles and practice. *Clin Invest Med* 1992; 15:163-86
 [7] Kneepkens CMF, Lepage G, Roy CC. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1994; 17:127-60
 [8] Hietanen E, Bartsch H, Bereziat JC, et al. Diet and oxidative stress in breast, colon and prostate cancer patients: a case control study. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48:575-86
 [9] Weitz ZW, Birnbaum AJ, Sobotka PA, Zarling EJ, Skosey JL. High breath pentene concentrations during acute myocardial infarction. *Lancet* 1991; 337:933-35
 [10] Sobotka PA, Gupta DK, Lansky DM, Costanzo MR, Zarling EJ. Breath pentene is a marker of acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13 224-29
 [11] Humad S, Zarling E, Clapper M, Skosey JL. Breath pentene excretion as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Free Red Res Commun* 1988; 5:101-06
 [12] Olopade CO, Zakkar M, Swedler WI, Rubinstein I. Exhaled pentane levels in acute asthma. *Chest* 1997; 11:862-65
 [13] Remmer H, Hintze T, Frank H, et al. Cytochrome P-450 oxidation of alkanes originating as scission products during lipid peroxidation. *Xenobiotica* 1984; 14: 207-219
 [14] Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, et al. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68:2374-2376
 [15] Phillips M, Herrera J, Krishnan S, et al. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 729:75-88
 [16] Phillips M. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. *Anal Chem*. 1997; 247:272-278
 [17] Phillips M, Kevin Gleeson, J Michael B Hughes, et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer : a cross-sectional study. *Lancet* 1999; 353:1930-33
 [18] Matthew Giardina and Susan V. Olesik. Application of low-temperature glassy carbon-coated macrofibers for solid-phase microextraction analysis of simulated breath volatiles. *Anal Chem*. 2003; 75:1604-1614
 [19] Phillips M., Cataneo R. N., et al. Volatile Markers of Breast Cancer in the Breath *The Breast Journal* 2003 9, 3:184-188