第四節 實驗材料

(一)實驗補充品

1. ＤＨＡ oil：為美國製造，經衛生署核准進口之食品，來自藻類萃取得到含 40% DHA 之產品，經本實驗室分析約含 DHA 35%，由於軟膠囊皆為動物膠囊，植物性膠囊只能做硬膠囊，用於粉末，而素食者對動物膠囊排斥情形甚為嚴重，為此只得將樣品盛裝於褐色玻璃瓶並以滴管方式服用，以增加參加者的意願與配合度。為免 DHA oil 暴露於空氣引起氧化，請參加者將 DHA oil 避光冷藏於冰箱，且採用小包裝 60 ml 一瓶，約為 10 天的服用量，每天早、晚各服用一次(每次 3 ml)，每瓶 DHA oil 並添加 1 IU 維生素 E/ml oil 作為抗氧化劑，以避免其過氧化。
2. Corn oil：為美國製造，經衛生署核准進口之食品，其中脂肪酸組成如表，給予方式與 DHA oil 相同，也是盛裝於褐色玻璃瓶，並以滴管方式，早、晚各服用一次(每次 3 ml)，每瓶 60 ml 約為 10 天的服用量，且每瓶 Corn oil 也添加 1 IU 維生素 E/ml oil 作為抗氧化劑，以避免其過氧化。

(二)分析用試藥

1. EDTA，Acetate：日本和光純藥株式會社。
2. Diethyl ether (HPLC grade)：法國 Fluka 公司。
3. Acetonitrile (HPLC grade)，Ammonium Acetate，Benzene，Ethanol，Chloroform，Hexane，Acetyl-chloride，KCL，KH_2PO_4，Methanol，NaBr，Na_2HPO_4，HCl：德國 E. Merck 公司。
4. Cholesterol enzymatic Kit，TG enzymatic Kit，Total Antioxidant Status assay Kit：法國 Randox 公司。
5. $CuCl_2$，thiobarbituric acid，BHT，Genistein，Daidzein，Flavone，

Butyrophone，Sulfatase，β-glucuronidase：美國 Sigma 公司。

6. 透析模 (MWCO：12-14000)：美國 Sectrum Medical Industries 公司。
7. Creatinine assay Kit：美國 Deagle 公司。
8. Estramettm2-16 ELISA assay kit：美國 Immuna Care 公司。
9. 8-iso-Prostaglandin F2α ELISA assay Kit：美國 Assay Designs 公司。
10. Apo (a) ELISA assay kit：美國 Mercodia 公司。

第五節 分析項目與方法

一、血液的收集

血液樣本為禁食 8 小時以上的空腹血液，採集均在參加者當日禁食早餐前進行，故參加者須於抽血前一晚 10 點以後至抽血前，除了開水外禁止食用任何食物或飲品。抽取 25 c.c.之上臂靜脈血液放入兩個含有 2.8 mg/ml 之 EDTA (Ethylenediaminetera-acetic acid)真空管各 10 c.c.，一個含肝素真空管約 5 c.c.，並保存於碎冰中(0~4℃)。

二、血漿的分離

收集到的血液，以 3000 rpm、15 分鐘、4℃的低速離心條件下分離血漿與血球，取上層血漿儲存於 2~8℃及-70℃，留待分析。

三、尿液的收集

抽血當天早上起床後收集第一次尿液，於事先準備好內含 15 mg Ascorbic Acid 粉末的 15 ml 塑膠試管及另一個空的 15 ml 塑膠試管中，並以冰浴方式維持尿液於低溫狀態(0~4℃)避免尿中物質變性影響測量準確性，要求參加者在家中收集並於抽血時交出。未加 Ascorbic Acid 粉末的 15 ml 塑膠試管於抽血當天加入 150 μl penicillin + streptomycin (100U/l)，此為留待分析尿液中 nitric oxide 含量。

收集之尿液以 3000 rpm、4℃的條件下離心 15 分鐘，使沉澱物分離出來，取出澄清部分，分裝儲存於-70℃直至分析。

四、尿液 creatinine 含量測定

採用市售的組合試劑，主要原理為 Jaffe reaction。Creatinine 與 picric acid 在鹼性的環境下反應成紅色，波長 510 nm 下可測其吸光值。將離心後的澄清尿液稀釋為原濃度的 10 倍，取 30 倍體積 working

reagent (picric acid 與 base reagent，v/v=1：1)在 37℃水浴下加熱 15 分鐘與之反應，波長 510 nm 下以 working reagent 作為 blank 歸零，並分別測各吸光值，經計算可得濃度。

計算方式：

Urine creatinine(mg/ml)= Unk. Abs ÷ Cal. Abs × 6.0 g/dl (cal conc) × 1.67 (corrects factor) × 10

五、尿液 Estrogen 代謝物 2OHE1/16αOHE1 含量測定

本實驗採用競爭型酵素免疫分析(Estramettm2/16，Immuna Care)。在這個分析中抗體先結合在 96 孔的分析盤上，尿液中未知的抗原(2OHE1 或 16αOHE1)會與另外加入已知量的抗原-酵素結合體（AG-Enayme complex）競爭和固相抗體結合的機會，當尿液中抗原愈多時，則抗原-酵素結合體與固相抗體結合的數目會減少，此時酵素標定反應物呈色愈低，表示尿液中抗原（2OHE1 或 16αOHE1）的量愈多。

將儲存於-70℃的尿液移至室溫，離心取得澄清樣本。分別取 10 μl 的標準品(0.625、1.25、2.5、5.0、10、15 ng/ml 的 2OH1 及 16α OHE1)、尿液樣本及蒸餾水（Blank）注入微試管中。然後加入 190 μl deconjugating enzyme 溶液於每個試管中混合均勻，獲得 1：20 稀釋的標準物及樣本，將其靜置於室溫下(20~25℃)2 小時後，加入 200 μl 的 neutralization buffer 進行中和反應，此時樣本及標準物被稀釋了 1/40 倍。接著迅速準備，使用 Tris-Buffered Saline 溶液(TBS，PH7.4，內含 0.05% Tween-20)清洗 2OHE1 及 16αOHE1 分析盤，至少 6 次，留待備用，需注意清洗後的分析盤必須盡快使用。

以 Multi-channel Pipette 由微試管中取出 75 μl 的稀釋 1/40 倍之標準物及樣本，迅速注入分析盤上相對應的 well 中(2OHE1 與 16α OHE1 兩個分析盤要同時操作)3 分鐘內分別加入 75 μl 稀釋成 1/2000

倍的 2OHE1：AP Conjugate 溶液及稀釋成 1/3000 倍的 16αOHE1：AP Conjugate 溶液於 2OHE1 分析盤及 16αOHE1 分析盤中每個 well 內，輕敲分析盤數分鐘使分析盤內溶液混合，靜置室溫中 3 小時(避開通風處及溫度變化處)。接著以 TBS 溶液清洗分析盤，迅速以 Multi-channel Pipette 取 100 μl AP Substrate，注入每個 well 中，5 分鐘後開始以生化酵素分析儀於 405 nm 下讀取吸光值，每 2 分鐘讀一次共 20 分鐘(Kinetic)。可計算出每個 well 內 2OHE1 或 16αOHE1 的絕對量。

將同一尿液樣本測得之 2OHE1 和 16αOHE1 絕對值相除即可計算出 2OHE1/16αOHE1 ratio。

六、血漿中 isoflavone 含量測定

主要依據 Franke 等人(142)萃取方法再稍作調整。主要原理為先調整血漿酸鹼值以利酵素水解切斷 isoflavones 與葡萄糖酸或硫酸鹽的鍵結，再以酸沉澱蛋白質後使用有機溶劑萃取出 genistein 與 daizein。

自-70℃取出血漿回溫至室溫，取 1.0 ml 血漿放入萃取用玻璃管，加入 0.25 ml 0.5 M triethylamine acetate(PH7.0)及 β-glucuronidase 363 U (From E.coli：100 U/ml；sigma)與 sulfatase 40 U (From Helix pomatia：120 U/ml；sigma)，並加入 20 μl flavone (120 ppm in 90% ETOH)當內標準品以作為定量校正用，用黑色螺旋蓋將玻璃管口封住，置於水浴加熱器 37℃下培養 17 小時。

將培養 17 小時的血漿加入 0.25 ml 10%的 trichoroacetic acid 溶液以沉澱蛋白質，並加入 2 ml ethyl acetate 有機溶劑萃取並離心(3000 rpm，5 分鐘)取上清液，重複上述步驟 3 次。將上清液以氮氣吹乾，以 150 μl Methanol 及 50 μl 0.2 M acetate buffer 回溶，用超音波細胞打碎機處理 30 秒，離心後取 20 μl 上清液打入 HPLC 分析。

HPLC 分析條件：

流動相為 methanol-0.1 mM ammonium acetate(v：v=6：4)，流速 0.6 ml/min，注射 20 μl 的樣品並記錄 254 nm 吸光值。從滯留時間和標準品來辨識 peak。並計算 genistein 與 daizein 在血漿中的含量。為避免血漿中其他複雜成分與內標準品滯留時間相同，因此採滯留時間較長的 flavone 作為內標準品，並做 genistein、daizeic 及 flavone 標準曲線，取適量標準樣品注入 HPLC。以其濃度對積分面積比(peak area ratio)作標準曲線，供分析血漿中濃度及內標準品回收率的換算用。標準曲線其 r 值為 0.99，滯留時間(retention time)分別為 11.33、15.02、34.98。

七、血液脂質之分析

1. 溴化鈉(Sodium bromide，NaBr)溶液配製

先配製三種 NaBr 溶液，其密度分別為 1.097、1.283、1.249 g/ml，每種密度溶液均含 1 mmol/l EDTA，取上述三種密度溶液 50 μl 分別加至 50 ml 的 1.097、1.283、1.249 g/ml 密度溶液，使最終濃度含 10 μmol/l EDTA 以避免 LDL 於分離過程中氧化，將此密度溶液留待備用。

2. 脂蛋白分離

血漿自-70℃取出快速解凍，取 3 ml 血漿加密度 1.097 g/ml 之 NaBr 溶液 0.5 ml 至超高速離心管，調整其混合溶液密度至 1.019 g/ml，以超高速離心機(Beckman LE-80，rotor 50.3)，在 4℃下以 41000 rpm 離心 16 小時，吸取上層密度小於 1.019 g/ml 之 VLDL＋IDL 淡白色層部分，每次吸取 200 μl，5 次共 1 ml。離心管剩餘液再加入 0.5 ml 密度為 1.283 g/ml 的 NaBr 溶液，同樣以 41000 rpm 離心 18 小時，得到上層密度為 1.019～1.063 g/ml 之褐黃色 LDL 部分，每次吸取 200 μl，5 次共 1 ml。最後再加 1 ml 密度為 1.249 g/ml 的 NaBr 溶液於剩餘液中，以 42500 rpm 離心 24 小時，得到上層密度為小於 1.125 g/ml 之紅棕色的 HDL_2，每次吸取 200 μl，5 次共 1 ml，離心管剩餘 2 ml 為

密度大於 1.125 的 HDL_3。

為測量確定所吸取的脂蛋白含量是否正確，將取出之 VLDL、LDL、HDL_2 與 HDL_3 以總膽固醇與三酸甘油酯之含量估計回收率是否達到 95%，分析期間儲存於 4℃冰箱，於四日內分析完畢。

3. 膽固醇含量測定

採用 enzymatic CHOD-PAR (Randox)法血漿及脂蛋白中的膽固醇含量。原理是利用 polythylene-glycerol- (p-1,1,3,3-tetramethyl-butyl) phenyl ether 和 polyethylene-glycerolmonalkyl ether，將脂蛋白中的 CHOL 及 CE 釋放出來，再以 cholesterol esterase 水解，經 cholesterol oxidase 氧化產生 H_2O_2，在 peroxidase 催化下，與 4-aminoantipyrine 與 phenol 作用產生淡紅色物質 quinoneimine 於波長 500 nm 下測其吸光值。

4. 三酸甘油酯含量測定

採用 enzymatic GPO-PAR (Randox) (Glycerphosphate oxidase，1-phenyl-2,3-dimethyl-4-aminopyrazolone)法分析血漿及脂蛋白中的三酸甘油酯含量。其原理是利用 lipoprotein lipase 將三酸甘油酯水解成 glycerol，glycerol 再由 glycerol kinase 及 glycerol-3-phosphate oxidase 的磷酸化和氧化作用，產生 H_2O_2，在 peroxidase 催化下，與 4-aminoantipyrine 及 phenol 作用，產生淡紅色之 quinoneimine，以波長 500 nm 測吸光值。

八、低密度脂蛋白的透析及其蛋白質濃度的測定

將超高速離心得到的 LDL (d=1.019～1.063g/ml)置入透析模，以 2000 倍體積之磷酸鹽緩衝液(PBS)進行透析(每次 1000 倍體積透析液，需要更換兩次)透析在暗室 4℃的低溫下進行，並以攪拌石攪拌，

第一次透析 4 小時後更換 PBS 並透析至隔天。透析完成之 LDL 以 Lowry 法(143)定量其蛋白質的濃度，在進行各項實驗前將其濃度調整成 200 μg protein/ml PBS，稀釋後立刻進行氧化實驗。

九、TBA (Thiobarbituric Acid)反應生成物測定

不飽和脂肪酸被氧化時所產生的 MDA (malon dialdehyde)會與 TBA 反應，而在波長 532 nm 下會有吸光值，以 $CuCl_2$ 為催化劑加入蛋白質濃度調整為 200 μg protein/ml PBS 的 LDL 中，$CuCl_2$ 最終濃度為 3.75 μM，置於 37℃水浴下進行氧化反應，當氧化反應完成後，取經上述氧化處理 0 小時、1 小時、2 小時、3 小時之 LDL 以 1：2 體積比的比例和 TBA 試劑(D.D water 2.5ml、100%w/v TCA 7.5ml、TBA 0.085g、4M HCl 1.25ml)混合，取 LDL 200 μl 加入 TBA 試劑中，並以 10 μM EDTA 來抓取銅離子和 40 μM BHT 抗氧化劑來終止氧化反應，並於 100℃乾浴下加熱 15 分鐘，加熱後置於室溫下冷卻，接著以高速離心 10,000 rpm 於室溫下離心 10 分鐘去除沉澱物質，取出上清液於 532 nm 下測吸光值，所得吸光值除以係數 $1.56 \times 10\ M^{-1}\ cm^{-1}$ 後換算成每毫克 LDL 蛋白質產生之 TBARS 量(nmol/mg protein)。

十、Conjugated Diene 生成之測量

以調整蛋白質濃度為 200 μg protein/ml PBS 之 LDL，加入 $CuCl_2$ 使銅離子最終濃度為 10 μM。LDL 被銅離子催化所生成之共軛雙烯或共軛烯 conjugated diene 在分光光度計(配控溫器)於 37℃下連續紀錄 234 nm 吸光值。掃描時以加等量銅離子之 PBS 為空白 blank 當對照、歸零，歸零之後測量參加者 LDL 的原始吸光值並記錄，之後分光光度計每 3 分鐘自動紀錄吸光值之變化一次，至 conjugated dienes 之生成量達飽和且不再有大幅度改變為止，利用 conjugated dienes 之

圖形，對 lag phase 及 propagation phase 做切現，而兩切線交點之橫座標即為延遲期(lag time)。

十一、血漿中總抗氧化狀態(Total Antioxidant Status)測定

採用市售的組合試劑(Randox Diagnostics, County Antrim UK)以 colorimetric method 測定，主要原理如下

Metmyoglobin ($HX\text{-}Fe^{3+}$) + H_2O_2 →Ferrylmyglobin ($X\ [Fe^{4+}=O]$) + H_2O

ABTS+$X\text{-}[Fe^{4+}=O]$ →ABTS*+$HX\text{-}Fe^{3+}$

ABTS：2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]。

ABTS*是一個相當安定的 radical cation，呈藍綠色波長在 600 nm 下可測其吸光值。若測試樣品中含有抗氧化劑則會抑制 ABTS*的形成。以 α -tocopherol analogue，6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxy-lic acid (Trolox)為標準品。每 1 單位(unit)的 TAS 定義為相當於 1 mmol/l Trollox 的抗氧化能力。測量總抗氧化狀態之血漿樣品是以含有肝素之真空管採集，此血漿樣品在 2~8℃下安定期為 36 小時，若存於-20℃可達 14 天。

十二、血漿中 lipoprotein(a)含量分析

採用市售的組合試劑(Mercodia Apo(a) ELISA)，是一種固相雙邊酵素免疫分析，其作用原理是在在分析盤上結合來自老鼠的抗 apolioprotrein(a)單株抗體，加入血漿樣本與已結合 peroxidase 的另一種抗 Apo(a)抗體 solution 培養 1 小時，再以簡單的清洗步驟，移除未結合的酵素標定抗體，欲偵測的共軛反應物質為 3,3',5,5'-teramethylbenzidine，最後以酸(1M H_2SO_4)終止反應，得到呈色物質。

分析時所有樣本與 control 都必須作二重複，依序取 standards、pretreated samples、pretreated control、各 25 μl 到分析盤上對應 well，

加入 conjugated solution 50 μl 到每個 well，上於室溫下培養 1 小時，並利用震盪器(shaker)使免疫反應充分進行，1 小時後以 washing solution 清洗分析盤 4 次，加入 200 μl peroxidase substrate，培養 15 分鐘，加入 50 μl stop solution，shaker 1 分鐘使確實混合均勻，之後以生化酵素分析儀於波長 450 nm 下讀取吸光值。

計算方式：

1 單位(unit) apolipoprotein(a)約等於 0.7 mg Lp(a) protein。

十三、血漿維生素 E(α-tocopherol)含量的測定

血漿 α-tocopherol 含量以高效液相層析儀(HPLC)測定之。

1.內標準物之配製：

取 α-tocopherol acetate 溶於 LC 等級的甲醇使其最終濃度為 4.68 μg α-tocopherol acetate/ml methanol，置於深色避光玻璃瓶中，保存於-20℃冰箱中。

2.血漿 α-tocopherol 的萃取

取血漿 0.1 ml，加入 0.1 ml 上述之內標準物於圓底頂端有旋蓋之玻璃試管中，接著加入 2 ml 含有 1% BHT 之乙醇，將旋蓋旋緊並外包防水膠布以防外漏。震盪 10 秒後加入 6 ml 己烷(hexane)，接著再將旋蓋旋緊震盪 5 分鐘後以 3000 rpm 離心 10 分鐘，離心後取上層 5 ml 之己烷層於全新可拋棄的玻璃試管中，以氮氣吹乾後加入 200 μl 的 LC 等級甲醇溶解之，並以 0.2 μm 之濾頭(filter)過濾，過濾後的萃取溶液保存於-20℃冰箱中留待 HPLC 分析。

3.分析條件

以超音波震盪除氣後之 LC 等級甲醇為流動相，流速為 1.0 ml/min，每次分析取 25 μl 之萃取液，測 UV 292 nm 下之吸光值；分析用管柱為 4.6 mm ×250 mm 之 C-18 reverse phase column。

4.計算方式

配五種已知重量的α-tocopherol acetate，以α-tocopherol acetate與α-tocopherol之重量比混合溶液經HPLC分析後得面積比以進行回歸定出標準曲線，在依各樣品中α-tocopherol acetate與α-tocopherol在積分機上的面積比以內插法套回標準曲線以換算出樣品中α-tocopherol 的含量。

十四、低密度脂蛋白脂肪酸組成分析

取 0.25 ml 的 LDL 加入 2 ml methanol-benzene (4：1，v：v，其中含有 0.4 mg margaric acid，C17:0)為內標準品，緩緩加入 200μl 醋酸氯(acetyl chloride)後，將試管旋緊置於 100℃水浴下進行皂化反應 1 小時。待以冷水浴冷卻後，緩慢加入 5 ml K_2CO_3 中和反應，再以低速離心分層後取上層(benzene 層)，用氮氣吹乾後再溶於正己烷，以氣相層析儀分析之。

1.分析條件：

分析管柱為 HP-FFAP 之 capillary column，規格為 0.32 mm ×0.52 mm，detector 為離子火焰檢定儀(Flame Ionization Detector)，以氮氣為 carrier gas，injector 之溫度為 230℃，dectector 之溫度為 250℃，column 之起始溫度為 160℃，維持 4 分鐘，然後以每分鐘升高 2.5℃之梯度升高至 225℃後維持 10 分鐘。

2.計算方式：

由 retention time 可知各脂肪酸相對位置，以各脂肪酸積分出之面積乘上其 theoretical FID factor，即可算出重量百分比(wt %)。

十五、尿液中 isoprostane 含量分析：

本實驗採用競爭型酵素免疫分析 (Correlate-EIA 8-iso-Prosta-glandin F2 α ,Assay Designs) 測量尿液中 8-iso-Prostaglandin F2α 含量。在這個分析中 96 孔的分析盤中結合抗

白兔抗體，當尿液中的抗原(8-iso-PGF2α)與另外加入已知量的抗原酵素結合體(8-iso-PGF2α-alkaline phosphatase)一起加入分析盤中會競爭與有限的白兔多株抗體結合，當尿液中的抗原多時，則抗原-酵素結合體與多株 8-iso-PGF2α抗體(polyclonal antibody)結合數目會減少，此時酵素標定反應物呈色愈低，表示尿液中抗原(8-iso-PGF2α)的量愈多。最後以稀釋的鹼性溶液終止酵素呈色反應，於波長 405 nm 下可測其吸光值。

操作時，所有尿液樣本及標準品都需二重複。先將儲存於-70℃的尿液移至室溫，離心取得澄清樣本以蒸餾水稀釋 100 倍待用，並配製標準品及清洗緩衝液(Wash Buffer)濃縮液以 10 倍的蒸餾水復原備用。將 1 μg/ml 的 8-iso-PGF2α標準品以 10 倍的分析緩衝溶液(Assay Buffer)稀釋之，之後再以稀釋 10 倍的標準品用 4 倍的分析緩衝溶液連續稀釋 7 次，共稀釋成 8 種濃度的標準品，分別為 100000，25000，6250，1563，391，98，24，6 pg/ml。

先取 100μl 的分析緩衝液注入分析盤上的對應 NSB (non-specific binding)及 Bo (maximum binding)的 well 內，在分別取 100μl 的尿液樣本及標準品注入分析盤上相對應的 well 內，之後取出 50μl 分析緩衝液注入 NSB 的 well 內使最後培養的體積一致。當分析盤已載入完成，使用 Multi-channel Pipette 取 50μl 藍色與鹼性磷酸酵素鍵結溶液加入每個 well 內，但 Blank 及 total activity (TA)位置的 well 不需加入，接著同樣使用取 50μl 黃色抗體溶液(polyclona antibody)至每個 well 內，但 Blank 及 TA 的 well 不需加入，此時分析盤的每個 well 為綠色，但 Blank 及 TA 的 well 為藍色，及 NSB 的 well 沒有顏色。

之後將分析盤在室溫下培養 2 小時，並利用震盪器(shaker)使免疫反應充分進行，2 小時後以復原之清洗緩衝溶液(Wash Buffer; Tris Buffer Saline)清洗分析盤至少 3 次，將洗好的分析盤在紙巾上輕拍乾淨，先加 5μl 藍色 8-iso-PGF2α與鹼性磷酸酵素鍵結溶液至 TA 的

well 內，以作為檢測酵素活性，然後使用 Multi-channel Pipette 取 200 μl 的受質(substrate)溶液加入每個 well 中，在室溫下培養 45 分鐘進行酵素呈色反應作用，於 45 分鐘後以 Multi-channel Pipette 取 50 μl 2N NaOH 加入每個 well 內終止反應，並以生化酵素分析儀於波長 405 nm 下讀取吸光值。

結果的計算：

1. 先求出樣本與標準的淨吸光值

平均淨吸光值=平均吸光值-吸光值

2. 算出標準品的最大結合百分比＝$\frac{\text{淨吸光值}}{\text{淨結合吸光值}}\times 100$

自對數結合百分比的標準取線算出尿液中 8-iso-PGF2α 濃度。

十六、尿液中 nitric oxide 含量測定

採用市售的組合試劑（Total Nitric Oxide Assay Kit），以 colorimetric method 測定，以 nitrate reductase 將 nitrate 轉換成 nitrite，並以分光光度計測量 nitrite 呈色物質在 540 nm 下的吸光值，主要原理如下：

$$NO + O_2^- \longrightarrow ONO_2^- \xrightarrow{H^+} NO_3^- + H^+$$

$$2NO + O_2 \longrightarrow N_2O_4 \xrightarrow{H_2O} NO_2^- + NO_3^-$$

$$NO + NO_2 \longrightarrow N_2O_3 \xrightarrow{H_2O} 2NO_2^-$$

尿液樣本在收集時需加入 penicillin + streptomycin (100U/l)以利儲存。試劑組在打開使用前需放置在室溫中回溫至少 30 分鐘，所有的標準品與尿液樣本都需做二重複，取 200 μl reaction buffer 到 blank well，50 μl 標準品到對應的 well，取 50 μl Reaction 到對應 well 作為 zero standard，取 50 μl 樣本到對應 well，依序取 25 μl final dilution 與 25 μl final enzyme dilution 到 zero standards，標準品、樣本的 well，混合均勻並在 37℃下培養 30 分鐘，依序取 50 μl griess reagent Ⅰ與 griess reagent Ⅱ到每個 well (除了 blank well)。混合均勻並於室溫中培養 10 分鐘，之後以生化酵素分析儀在 550 nm 下測其吸光值。

第六節 實驗品質控制

(一)為使血漿中所含濃度相近以免影響 LDL 之氧化難易性，因此採血時使用的真空採血管盡量抽滿使接近 10 ml，並取離心後所得的血漿進行各種脂蛋白的分離。

(二)為提高測量值的準確性，故在測量血漿中及各脂蛋白所含之膽固醇與三酸甘油酯濃度、LDL 蛋白質濃度、血漿中總抗氧化狀態、血漿中 lpoprotein(a)、尿液中 creatinine 濃度、尿液中 nitric oxide 濃度等項目時皆以二重複的實驗方式進行測量以減少測量誤差。

(三)測量膽固醇與三酸甘油酯時每次實驗皆使用時器提醒反應時間，以維持一致性使達最大準確度，此外，於測量的同時以 control serum 的測量值來校正測量結果，本實驗中膽固醇濃度之 interassay CV=2.36%，三酸甘油酯濃度之 interassay CV=2.14%。

(四)完成透析之 LDL 經稀釋後應馬上進行 conjugated diene 的實驗，否則應保持於低溫、暗室中以避免其氧化反應的進行。

(五)在一些文獻中指出，LDL 在冷凍的血漿(-70℃)達 8~24 週並不會影響 LDL 氧化速率及 lag time (66)，本實驗採用冷凍血漿分離脂蛋白進行體外氧化實驗，儲存時間約 7 週。

(六)為提高測量值的準確性，尿液 estrogen 代謝物分析以三重複測量方式進行，同時使用 control urine 測量，以了解不同次分析間的變異性。過去研究指出使用 ELISA 技術時，interassay 與 intraassay CV 需小於 9%(33)，本實驗分析 2OHE1 之 interassay CV=7.7%，intraassay CV=3.2~12.3%，16αOHE1 之 interassay CV=3.1%，intraassay CV=0.9~5.2%。

第七節 統計分析

數值以平均值加減標準(means±SD)表示，使用 SPSS/PC+(For Windows)軟體進行測量數值的統計分析：

實驗一、葷食與素食停經婦女血漿異黃酮濃度與尿液中雌激素代謝物排出量之比較

1. One-Way ANOVA

比較葷食者與素食者血漿中 isoflavones 含量與尿液中雌激素代謝產物含量之組間的差異。

2. Spearman's correlation

分析葷食組與素食組尿液中 isoflavones 含量與雌激素代謝產物含量的相關性。

實驗二、素食停經婦女補充藻類 DHA 對其心血管疾病危險因子之影響

1 One-Way ANOVA

比較與 DHA (normal)組與 placebo (normal)組在補充前與補充後血脂質、LDL 氧化、血漿中維生素 E 含量、血漿中總抗氧化狀態、血漿中 lpoprotein(a)含量、尿液中 isoprostane 含量，尿液中 nitric oxide 含量等組間的差異。

2. Paired T-Test

比較 Placebo (normal)組、DHA (normal)組與 DHA (hyperlipidemic)組補充後血脂質、LDL 氧化、血漿中維生素 E、lpoprotein(a)含量、尿液中 isoprostane、nitric oxide 含量、尿液中雌激素代謝產物含量的變化。

第八節 研究限制

(一) 符合條件的素食停經婦女招募不易。由於參加者篩選條件相當嚴格，必須身體健康，未罹患所服用藥物會影響身體代謝或血脂等慢性病，如肝、腎與甲狀腺疾病或高血壓、高血脂及其他疾病，確實停經至少一年以上且無使用任何荷爾蒙補充，素食組必須採取素食為其固定飲食型態至少一年以上，且平日沒有規律服用抗氧化補充劑，諸多條件設計外，尚需參加者配合共 3 次的抽血檢驗，而除了免費提供 DHA oil 外無法提供任何津貼或報酬，使得本研究在剛開始招募參加者時困難度提高。

(二) DHA oil 具有近似一般魚油的魚腥味，要讓素食參加者接受頗為困難。魚油補充劑的魚腥味即便是葷食者也有部分人難以接受，遑論是長年未吃魚甚至是不曾吃過魚的素食者，因此在 DHA oil 的接受與配合度部分大打折扣，且 DHA oil 與 Corn oil 之間的差異難以平衡，因而容易被參加者發現，故需要花費更大心力勸導、督促他們每日配合服用補充劑，在時間與人力資源不足的情況之下，較不易維持此部份的實驗品質。

(三) 補充劑以滴管方式讓參加者服用，且須低溫冷藏保存，增加參加者的使用不便，且服用量無法精確一致。常見的軟膠囊皆為動物膠所製，無法提供給素食者使用，因此以滴管方式給予，教導參加者每次使用皆要吸滿整個滴管才算一次(1 ml)，但是每個人使用滴管的技巧不一，與使用膠囊方式相比，每日服用量無法精確統一，且補充劑開罐後需冷藏保存，不方便攜帶外出，如此一來增加參加者的使用不便，進而影響服用量，這些問題都會影響實驗品質。

第四章 結果

實驗一、葷食與素食停經婦女血漿異黃酮濃度與尿液中雌激素代謝物排出量之比較

(一) 基本資料

參加者包括葷食組 26 人與素食組 34 人，兩組的年齡、停經年術、身高及體重皆無顯著差異(資料未呈現)。由於受試者的年齡與停經年齡有可能影響其尿液中雌激素代謝產物的分布，故對於有測量尿液中雌激素代謝產物的受試者(葷食組 18 人、素食組 25 人)，另外分析其年齡與停經年齡，結果顯示葷食組受試者平均年齡 53.3±5.7 歲，平均停經 6.0±6.5 年，素食組的平均年齡為 52.4±4.7 歲，平均停經 4.8±4.0 年，兩組間皆無顯著差異(如表一)。

(二)血漿中 Isoflavones 濃度的差異

素食停經婦女血漿中 daidzein 與 genistein 濃度皆明顯較葷食停經婦女高，p 值均為 0.02 (如表二)。

(三)尿液中雌激素代謝產物

此分析項目在一開始進行的並不順利，之前只測得 2OHE1/creatinine 濃度，後來重新分析才得到較完整的結果，而將兩次分析所得之 2OHE1/creatinine 濃度有顯著的相關性，p 值皆小於 0.001 (未呈現數據)。

結果顯示素食組尿液中雌激素代謝產物 2OHE1/creatinine 濃度及 2OHE1/16αOHE1 ratio 皆明顯比葷食組高，p 值分別為 0.01 與 0.04，16αOHE1/creatinine 在兩組間則無顯著差異(如表三)。

(四) 血漿中 Isoflavones 濃度與尿液中雌激素代謝產物之間的相關性

尿液中雌激素代謝產物 2OHE1/16αOHE1 ratio 明顯與血漿中 daidzein 濃度成正相關(r=0.53，p=0.004)，而 16αOHE1/creatinine 濃度與 daidzein 之間則有負相關的趨勢，但未達顯著差異 (r=-0.32，p=0.108) (如表四)。

實驗二、素食停經婦女補充藻類 DHA 對其心臟血管疾病危險因子之影響

(一)受試者人數

招募之初正式進入研究的素食者共 39 人，研究期間退出者共 5 人，歸納其原因有覺得會拉肚子，不舒服，而不願再繼續 (1 人)，不適應 DHA 補充劑味道者 (1 人)，缺乏耐心無法持續至研究結束 (1 人)，家中變故不克前來抽血 (2 人)，後測時無法取得足夠血液樣本(1 人)，故全程完成研究的受試者共 33 人。

(二)樣本數

有的實驗幾經重測，部分樣本用罄，使得各分析項目樣本數參差不齊，如 LDL 體外氧化實驗及血漿中 α-tocopherol 含量分析，另外以酵素免疫分析法測量的項目，當樣本濃度太低或太高時就會超出標準曲線的偵測範圍，無法得知樣本正確濃度，又因試劑以盤為單位，很難位少數幾個樣本需重測而多購買一整盤，故樣本數減少，如血漿中 Lp(a)、尿液中 isoprostane 與 nitric oxide 等含量分析。

(三)血脂正常之受試者的結果

1. 基本資料

Placebo 組平均年齡為 52.8±5.7 歲，平均停經 5.8±5.2 年，平均素食飲食 13.3±9.0 年，共 12 人。DHA 組平均年齡為 53.6±5.1 歲，平均停經 6.1±4.2 年，平均素食飲食 21.1±12.6 年，共 12 人。經由統計分析發現受試者在實驗初期兩組的年齡、停經年數、身高、體重皆無顯著差異，且於服用補充劑 6 週後兩組體重無顯著改變，兩組間也無顯著差異（如表五）。

2. 實驗室分析之組內比較

（1） 補充後，DHA 組與 placebo 組血中的三酸甘油酯，兩組皆無顯著改變（如表六）。

（2） 補充後，DHA 組的血中 VLDL-膽固醇明顯下降，placebo 組皆無任何顯著改變（如表八）。

（3） 補充後，placebo 組與 DHA 組血漿中 lipoprotein (a)含量，兩組皆無顯著改變（如表十）。

（4） 補充後，DHA 組在 1 小時、2 小時與 3 小時的 TBARS 生成量明顯增加(p=0.02，p=0.04，P＝0.003)，placebo 組則無顯著改變，且兩組 conjugated dienes 形成之 lag time 在補充後皆無顯著改變（如表十一）。

（5） 補充後，DHA 組血漿中 α-tocopherol 含量明顯下降(p=0.03)，placebo 組則無顯著改變（如表十三）。

（6） 補充後，DHA 組與 placebo 組的尿液中 isoprostane 濃度，兩組皆無顯著改變（如表十四）。

（7） 補充後，DHA 組與 placebo 組尿液中 nitric oxide 含量，兩組皆無顯著改變（如表十五）。

（8） 補充後，DHA 組 LDL 中 DHA 含量明顯增加(p＜0.001)，placebo 組則無顯著改變（如表十六）。

3. 實驗室分析之組間比較

（1） 補充前 placebo 組與 DHA 組之血中三酸甘油酯無顯著差異，補充後兩組亦無差異，以差值作比較也無顯著差異（如表六、表七）。

（2） 補充前 DHA 組的 VLDL-C 與 HDL_3-C 比 placebo 組低(p=0.02，p=0.01)，補充後 DHA 組的 VLDL-C 也比 placebo 組低(p=0.02)，以差值作比較則無顯著差異（如表八、表

九）。

（3） 補充前 placebo 組與 DHA 組之血漿中 lipoprotein (a)含量無顯著差異，補充後兩組亦無差異（如表十）。

（4） 補充前 placebo 組與 DHA 組之 TBARS 生成量、conjugated dienes 形成之 lag time 的變化無顯著差異，補充後兩組亦無差異，由於此種實驗無法控制不同次的實驗品質相同，故組間比較不重要（如表十一）。

（5） 補充後，placebo 組與 DHA 組之血漿中總抗氧化狀態無顯著差異（如表十二）。

（6） 補充後 DHA 組血漿中 α-tocopherol 含量明顯比 placebo 組低($p=0.03$)，補充前兩組無顯著差異（如表十三）。

（7） 補充前 placebo 組與 DHA 組之尿液中 isoprostane 含量無顯著差異，補充後兩組亦無顯著差異（如表十四）。

（8） 補充前 placebo 組與 DHA 組之尿液中 nitric oxide 含量無顯著差異，補充後兩組亦無顯著差異（如表十五）。

（9） 補充後，DHA 組 LDL 中 DHA 含量比 placebo 組高($p<0.001$)，補充前兩組無顯著差異（如表十六）。

(四)血脂偏高之受試者的結果

1.基本資料

Hyperlipidemic 組平均年齡為 55.0±4.8 歲，平均停經 7.2±6.1 年，平均素食飲食 14.0±12.0 年，補充 DHA 後體重無顯著改變（如表十七）。

2.實驗室分析之組內比較

（1） Hyperlipidemic 組補充 DHA 後，血中三酸甘油酯無顯著改變(如表十八)。

（2） Hyperlipidemic 組補充 DHA 後，血中膽固醇無顯著改變(如表十九)。

（3） Hyperlipidemic 組補充 DHA 後，血漿中 lipoprotein (a)含量無顯著改變(表二十)。

（4） Hyperlipidemic 組補充 DHA 後，只有 dienes 最大吸光值明顯下降(p=0.03)，而 TBARS 生成量與 conjugated dienes 形成之 lag time 皆無顯著改變(表二十一)。

（5） Hyperlipidemic 組補充 DHA 後，血漿中 α-tocopherol 含量無顯著改變(表二十二)。

（6） Hyperlipidemic 組補充 DHA 後尿液中 nitric oxide 濃度明顯增加(p＝0.01)(表二十三)。

（7） Hyperlipidemic 組補充 DHA 後尿液中氧化物質 isoproatane 濃度無顯著改變(表二十四)。

（8） Hyperlipidemic 組補充 DHA 後 LDL 中 DHA 含量明顯增加(p=0.004)(表二十五)。

(五) DHA 補充後尿液中雌激素代謝產物的變化

補充後 DHA 組與 placebo 組的尿液中雌激素代謝產物 2OHE1/creatinine 濃度、16αOHE1/creatinine 及 2OHE1/16αOHE1 ratio 皆無顯著改變，且兩組間也無任何差異(表二十六)。