

第三章 研究方法

第一節 研究對象

一、研究對象

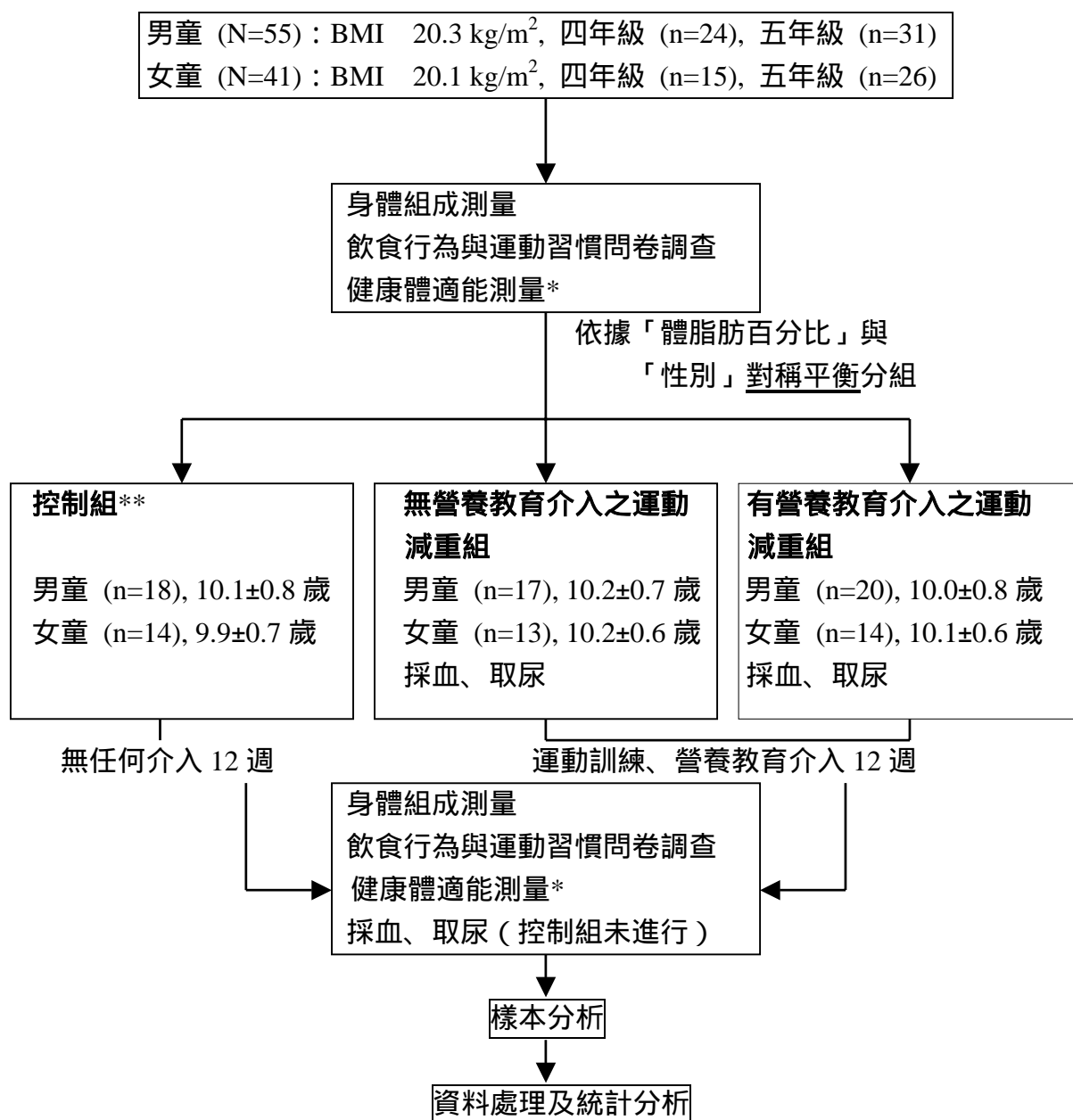
本研究乃教育部委託台北市信義區三興國民小學（三興國小）辦理之學校輔導學生體重控制實施方案（附錄一），經徵得學童家長同意後，受試者為自願參與運動減重之四、五年級體重過重之男、女學童（男生 BMI 20.3 kg/m^2 ，年齡 10.1 ± 0.7 歲；女生 BMI 20.1 kg/m^2 ，年齡 10.1 ± 0.6 歲）。

在營養教育介入前、後均進行身體組成之測量；「飲食行為與運動習慣問卷」（附錄二）之調查；健康體適能之測量，包括：坐姿體前彎、1 分鐘仰臥起坐、立定跳遠、800 公尺跑走共四項，並採血及取尿。問卷調查進行時間分別為民國 92 年 10 月以及民國 93 年 1 月。並於問卷訪談結束後，告知受試者各項目測量之時間、地點及注意事項。測量日期分別為民國 92 年 10 月 6 日、7 日，以及 93 年 1 月 15 日、16 日，進行身體組成分析之測量，並採血及取尿。完成前測問卷調查之受試者共 71 位，其中 7 位受試者，未完成其它項目之測量，因此完整參與整個研究之受試者共 64 位，男 37 位、女 27 位（四年級 25 位、五年級 39 位）。

此外，另蒐集三興國小同年齡層之四、五年級體重過重的學童共 32 位，男 18 位（男生 BMI 20.3 kg/m^2 ，年齡 10.1 ± 0.8 歲）女 14 位（BMI 20.1 kg/m^2 ，年齡 9.9 ± 0.7 歲）（四年級 14 位、五年級 18 位），民國 93 年 10 月以及民國 94 年 1 月先後進行身體組成之測量、「飲食行為與運動習慣問卷」之調查、健康體適能之測量以作為控制組之對照資料。而顧及採血乃侵入性之研究方法，控制組也未經家長同意參加體重控制計畫，故控制組沒有進行採血及取尿。

第二節 研究工具與方法

一、實驗設計流程



*健康體適能測量：坐姿體前彎、1 分鐘仰臥起坐、立定跳遠、800 公尺跑走。

**顧及採血乃侵入性之研究方法，未經家長同意且未參加體重控制計畫，故控制組於介入前、後均未進行採血及取尿。

二、資料收集與測量方法

(一) 身體組成分析

受試者先測身體組成，再依體脂肪百分比與性別對稱平衡 (counter balance)地分配於六組，分別為：控制組男童、無營養教育介入之運動減重男童、有營養教育介入之運動減重男童；控制組女童、無營養教育介入之運動減重女童、有營養教育介入之運動減重女童。運動減重四組與控制二組在營養教育介入前、後，均進行身體組成分析之測量。受試者在測量身高後即進行身體組成之測量。在室溫 (~26) 下，空腹 3 小時以上，期間並不得運動，藉由身體組成分析儀 (Segmental Bioelectrical Impedance Analyzer, SBIA, InBody 3.0, Biospace Co., Ltd., Korea) 測量，受試者著寬鬆衣物，除去附件及飾品，並脫去鞋、襪以進行測量，身高精確度至 0.5 公分，體重精確度至 0.1 公斤，受試者立於身體組成分析儀之站板上，雙手各握傳導器，自然下垂且微微張開 (以免碰觸身體而影響到測量之準確性)，四肢共計有八段與傳導器接觸，以進行測量。測量項目包括：總體重、除脂體重 (fat-free mass, FFM)、體脂肪重 (fat mass, FM)、肌肉重 (muscle mass, MM)、身體總水重 (total body water, TBW)、骨重 (bone mass, BM)、身體質量指數 (body mass index, BMI)、腰臀比 (waist to hip ratio, WHR)、三頭肌皮脂厚度 (triceps skinfold thickness, TSF)等。

(二) 問卷調查

在營養教育介入前、後，所有受試者 (含控制組) 均進行問卷調查。由研究者自行設計之「飲食行為與運動習慣問卷」，經專家檢定後確定效度，信度則由隨機抽樣 20 位四、五年級學童 (非本研究受試者) 先行做問卷調查，經修正後發展為本次研究問卷。由受過營養專業訓練並實習過之研究諮詢人員，進行一對一的面談調查，全程諮詢皆由同一諮詢員執行，在進行諮詢時，同時配合使用行政院衛生署發行的『臺灣常見食品營養圖鑑』(行政院衛生署，民 87)，並由諮詢員當

場親自據實填寫問卷，以確保受試者回答之正確性。

此外，為確保參加此次運動減重之國小學童問卷之正確性，於每次諮詢完「飲食行為與運動習慣問卷」後，並做家長問卷調查（附錄三），敦請學童家長據實回答學童實際家居之飲食生活（零食及宵夜攝取）與運動習慣，於隔日繳回家長問卷，以供對照使用。

（三）健康體適能測量

在營養教育介入前、後，所有受試者（含控制組）均進行健康體適能測量，包括：坐姿體前彎、1 分鐘仰臥起坐、立定跳遠、800 公尺跑走等四項，檢測法以教育部（民 86）所頒佈之方法實施。

（四）採血、取尿

1. 採血：在營養教育介入前、後，各採血一次。運動減重四組受試者須空腹 10 小時以上，由領有執照之醫護人員進行，取前臂靜脈血約 5 至 6 ml，收集於 sodium heparin 真空管中。收集到的血液離心 15 分鐘（ $150 \times g$ ，室溫），取出上層之血漿，儲存於 -70 之凍箱，留待分析。
2. 取尿：在營養教育介入前、後，各取尿一次。於測試當日早晨發給運動減重四組受試者免洗杯及集尿管，以取其晨起第一次之尿液，並告知受試者其前、後段尿液不要，收集後繳回，儲存於 -20 凍箱，留待分析。

（五）運動訓練課程

參與運動減重之國小學童（共 64 人）每人每週均施行三次，每次各 40 分鐘之運動課程。整個運動課程進行時間為民國 92 年 10 月 20 日至民國 93 年 1 月 12 日，共進行 36 次課程。運動種類包括：有氧舞蹈、新式健康操、快走/慢跑、跑步遊戲等，共 12 週。每次運動強度為 65-80% 最大心跳率（maximum heart rate,

HR_{max})。

(六) 營養教育課程

所有受試學童 64 人皆進行運動減重之課程，但其中僅 34 人（四年級 14 人，五年級 20 人）進行營養教育介入課程，每週二次每次各 40 分鐘。營養教育課程是依據『學生體重控制指導手冊』（教育部體育司，民 90），以及研究者自編之營養教材來實施。整個營養教育課程進行時間為民國 92 年 10 月 20 日至民國 93 年 1 月 8 日，共進行 24 次課程。並於每次營養課程結束後，施予研究者針對該次營養課程所設計之考題測驗，測量學童該次上課內容的學習成效，每次最高得分為 5 分，共進行 20 次，滿分為 100 分。經營營養教育課程結束後，學童之平均分數為 85.9±13.9 分。營養教育課程內容包括有：向肥胖說不、你為什麼胖起來?、「一份」努力，「一份」收穫、戲說熱量、進食寶典、問世間「脂肪」為何物?、與「食物纖維」共舞、「零食」「點心」公開賽、食品身分證、外食秘笈、如何說「不」、食物總動員—健康的食物、如何做好飲食控制、你是油罐子嗎?、欣賞自己、爸爸的小秘方—蔬果、是非分明、理想體重及食物份量、如何身體力行、聰明減重健康吃、我發誓，我再也不要胖回來了!、減重大進擊等 24 節課，共 12 週。

三、實驗樣品分析

(一) 空腹血漿

1. 胺基酸：Glutamine，Alanine，Valine，Leucine，Isoleucine，f-Tryptophan，經由高效能液相色層分析儀 (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC, AccQ-TAG 方法，Waters Corp., USA) 測定。

(1) 試劑：

- a. Glutamine 之 stock 標準液：將 0.0146 g Glutamine 以二次蒸餾二次去離子水定容 (distilled, deionized water, D.D. water) 至 25 ml，濃度 4 μmole/ml。

- b. Alanine , Valine , Leucine , f-Tryptophan 之 stock 標準液：分別將 0.0089 g Alanine , 0.0117 g Valine , 0.0131 g Leucine , 0.0204 g f-Tryptophan 以 20mM HCl 定容至 25 ml , 濃度 4 μ mole/ml。
- c. Isoleucine 標準液：將 0.0131 g Isoleucine 以 20 mM HCl 定容至 50 ml , 濃度 2 μ mole/ml。
- d. 移動液：Eluet A (AccQ·Tag, Waters Corp., USA) + D.D. water (1:10, v/v)。
- e. 清洗液：acetonitrile (AS-1122, TEDIA Inc., USA) + D.D. water (3:2, v/v)。
- f. 衍生試劑：AccQ Flour Borate Buffer 1 (AccQ 1) AccQ Flour Reagent Powder 2A (AccQ 2A)、 AccQ Flour Reagent Diluent 2B (AccQ 2B) (Waters Corp., USA)。

(2) HPLC :

管柱 3.9 \times 150 mm (AccQ·Tag, Waters Corp., USA) , 管柱溫度 37 , 流速 1.0 ml/min , 以紫外線偵測器 (Tunable Absorbance Detector, Waters 486, Waters Corp., USA ; 波長 254 nm)及螢光偵測器 (Scanning Fluorescence Detector, Waters 470, Millipore Corp., USA ; 激發波長 250 nm、放射波長 395 nm)偵測吸光值。

(3) 步驟 :

- a. 配製衍生試劑：乾熱器 (Barnstead/Thermolne dri-bath, DB28125, USA)預熱至 55 。將 AccQ 2A 試劑之粉末完全震盪至瓶底 , 先以 1 ml AccQ 2B 試劑潤濕微滴管 , 再另取 1 ml AccQ 2B 試劑加入 AccQ 2A 瓶中 , 充分混合使之均勻溶解 (此乃 AccQ 2 溶液) , 再將 AccQ 2 溶液放入乾熱器 (55 , 10 分鐘) , 時間到立即取出 , 靜置冷卻至室溫 , 方可進行衍生。
- b. 胺基酸混合標準液取量如表 3-1。

表 3-1 血漿胺基酸混合標準液中各胺基酸 stock 標準液之取量 (μl)*

	混合標準液 1	混合標準液 2	混合標準液 3	混合標準液 4
Glutamine	375	750	1125	1500
Alanine	150	400	750	1000
Valine	110	350	450	600
Leucine	90	175	250	350
Isoleucine	75	220	400	600
Tryptophan	15	50	125	200
D.D. water	4185	3055	1900	750
總體積(μl)	5000	5000	5000	5000

*D.D. water: distilled, deionized water.

- c. 血漿回溫，離心 ($1000 \times g$, 10 , 20 min)後，取上層液 100 μl，與 100 μl 之 20 mM HCl 混勻後放入微量過濾離心管 (ultrafree-MC, UFC3LGC00, Millipore, USA)，再超高速離心 6.5 分鐘 (桌上型超高速微量離心機，MicroCen13, Herolab, Germany)。
- d. 離心後，取下層濾液 20 μl 以 AccQ-Tag 方法進行衍生，冷卻後經 HPLC 測定六種胺基酸之血漿濃度。
- e. 衍生方法：下層濾液 20 μl (標準液取 10 μl)，加 AccQ 1 試劑 60 μl (標準液則加 70 μl) 充分混勻，再加入加 AccQ 2 溶液 20 μl (標準液也加 20 μl) 充分混勻後靜置 1 分鐘，將 100 μl 溶液 (標準液 100 μl) 取至 HPLC 專用 Vial 瓶中，放入乾熱器 (55 , 10 分鐘) 加熱，時間到立即取出，輕敲 Vial 瓶壁去除氣泡後靜置冷卻至室溫，方可進行 HPLC 之測定。

2.血脂肪：

- a. 總膽固醇 (total cholesterol)：以 Cholesterol oxidase 及 Esterase peroxidase 方法測定 (Beckman LX20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)。
- b. 三酸甘油酯 (triacylglycerol)：以 Enzymatic, endpoint 方法測量 (Beckman LX20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)。
- c. 高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-cholesterol)：以 Liquid selective detergent 方法測定 (Beckman LX20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)。
- d. 低密度脂蛋白膽固醇 (LDL-cholesterol)：以 Direct surfactant 測定 (Beckman LX20, Beckman Coulter Inc., Japan)。

3.血糖：以 Glucose oxidase 方法測定 (Beckman LX20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)。

(二)尿液

1.羥基脯胺酸 (hydroxyproline, HP)、3-甲基組胺酸 (3-methylhistidine, 3-MH)：以 AccQ-Tag 方法，由 HPLC 測定。

(1)試劑：

- a. HP 之 stock 標準液：將 0.0131 g 之 HP 以 20 mM HCl 定容至 50 ml，濃度 2 μ mole/ml。
- b. 3-MH 之 stock 標準液：將 0.0169 g 之 3-MH 以 20 mM HCl 定容至 25 ml，濃度 4 μ mole/ml。
- c. 移動液：同血漿胺基酸測定。
- d. 清洗液：同血漿胺基酸測定。
- e. 衍生試劑：同血漿胺基酸測定。

(2)HPLC：

管柱 3.9 \times 150 mm (AccQ-Tag, Waters Corp., USA)，管柱溫度 37，流速 1.0

ml/min，以螢光偵測器（激發波長 250 nm、放射波長 395 nm）偵測吸光值（同血漿胺基酸測定）。

(3)步驟：

- a. 配製衍生試劑（同血漿胺基酸測定）。
- b. 胺基酸代謝物混合標準液取量如表 3-2。

表 3-2 尿液代謝物混合標準液中各胺基酸代謝物 stock 標準液之取量 (μl)*

	混合標準液 1	混合標準液 2	混合標準液 3	混合標準液 4
HP	20	50	100	400
3-MH	50	250	500	750
D.D. water	4930	4700	4400	3850
總體積(μl)	5000	5000	5000	5000

*HP: hydroxyproline; 3-MH: 3-methylhistidine; D.D. water: distilled, deionized water.

- c. 尿液回溫，離心 ($700 \times g$, 10 , 20 min)後，取上層液 100 μl，與 300 μl 之 6 N HCl 混勻，於 110 烘箱水解 3.5 小時，使 HP 水解成游離狀態，回溫後混勻、離心 ($700 \times g$, 10 , 20 min)。
- d. 離心後取上層液 20 μl 真空乾燥 (Vacuum Station, Millipore Corp., USA) 後，以 20 μl 之 20 mM HCl 定容後進行衍生 (AccQ-Tag, Waters Corp., USA)，以 HPLC 測定兩種胺基酸代謝物之尿中濃度。
- e. 衍生方法：同血漿胺基酸測定。

2.肌酸酐 (Creatinine, Cr)：以 Jaffe Reaction 方法測量。

(1)試劑：

- a. 2/3N sulfuric acid (H_2SO_4)

- b. 10% (w/v) sodium tungstate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- c. 175% (w/v) picric acid ($\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3\text{OH}$)
- d. 10% (w/v) sodium hydroxide (NaOH)
- e. 鹼性苦味酸溶液 (alkaline picrate solution) : 每次使用前均需新鮮配製, 以 5 ml 1.175% picric acid + 1ml 10% NaOH 混勻備用, 避光。
- f. 肌酸酐之 stock 標準液 : 將 0.0500 g 之 Cr 以 0.1N HCl 定容至 50 ml , 濃度 1 mg/ml。
- g. 肌酸酐之 working 標準液 : 將 1 ml 之 stock 標準液以 0.1N HCl 定容至 100 ml , 濃度 0.01 mg/ml。

(2)步驟 :

- a. 肌酸酐混合標準液取量如表 3-3 , 並製作標準曲線。

表 3-3 尿液肌酸酐混合標準液中 working 標準液之取量 (μl)*

	Blank	混合標準液 1	混合標準液 2	混合標準液 3	混合標準液 4	混合標準液 5
Cr-working	0	40	200	400	800	1200
D.D. water	2000	1960	1800	1600	1200	800
總體積(μl)	2000	2000	2000	2000	2000	2000

*Cr: Creatinine; D.D. water: distilled, deionized water.

- b. 尿液回溫, 取混勻之尿液 20 μl 加 D.D. water 980 μl 稀釋成 50 倍, 依序加入 7 ml D.D. water , 1 ml 2/3 N H_2SO_4 , 與 1 ml 10% Na_2WO_4 , 混勻後離心 (250 \times g, 4 , 20 min) , 離心後取上層液 2 ml。
- c. 取出之上層液 2 ml , 在避光環境下, 再加入 2.5 ml alkaline picrate solution 混勻後, 靜置 20 分鐘, 經由分光光度計 (Spectrophotometer, Spectronic

Genesys 5, Milton Roy, USA)波長 520 nm 測吸光值，參考標準曲線測定肌酸酐之濃度 (Owen, Iggo, Scandrett & Stewart, 1954)，並作二重複，取其平均值。

3.酸鹼值：經由酸鹼值離子測定儀 (Ion analyzer M-3000, Suntext Corp., Indianapolis, IN, USA)測定，步驟如下：

- (1)尿液回溫，混勻。
- (2)測定儀經標準液校正後，進行尿液酸鹼值之測定。
- (4)全部樣本測量完一次後，再進行第二次測量，取兩次之平均值。

第三節 統計分析

資料收集齊全後，經整理後輸入電腦，利用 SAS 統計套裝軟體 (9.0 版, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)進行資料分析，以 paired-t 考驗 (paired-t test)比較介入前、後之身體組成、飲食攝取、健康體適能、尿液及血液生化檢驗各項指標差異。以 One Way ANOVA 比較各組介入前、後之身體組成、飲食攝取、健康體適能、尿液及血液生化檢驗各項指標改變量之差異，並比較各項平均值之顯著差異 ($p < 0.05$)，以平均值 \pm 標準差 (mean \pm S.D.)表示。