

## 第三章 研究方法

### 第一節 研究對象

#### 一、研究對象

招募台北市大安區，於民國 92 年足歲滿 60 歲(含 60 歲)以上，有自主意識及運動能力，志願參與本研究活動的社區居民。依照規律運動習慣將受試者分為：高運動男性、低運動男性、高運動女性、低運動女性，共四組。本研究的計畫案經財團法人長庚紀念醫院人體試驗倫理委員審查通過(附錄一)。

#### 二、受試者招募

研究執行前在台北市大安區成功國宅社區張貼海報(附錄二)，招募受試者，並到附近老人活動處說明研究目的及內涵，發放受試者同意書(附錄三)，有意參與活動者填寫資料後繳回。

回收受試者同意書後，篩選符合條件者，以電話聯繫，確定對方參與研究之意願，再預約面訪的時間，以進行「飲食行為與運動習慣問卷」(附錄四)調查。整個問卷調查進行時間為民國 92 年 6 月，為期約 3 週。訪談當天結束時，告知受試者其他項目測量之時間、地點及注意事項(附錄五)，進行脈搏、血壓、身體組成分析、骨質分析、握力與腳力之測量，採血及取尿，測量日期為民國 92 年 6 月 27 日、28 日兩天之上午。完成問卷調查之受試者共 59 位，其中 3 位受試者，因故不克前來進行其他項目之測量，因此完整參與整個研究之受試者共 56 位，男 26 位，女 30 位。

### 三、測量員招募

招募師大人類發展與家庭學系二、三年級之同學。

1. 招募條件：對營養研究有興趣者，願意學習並執行相關測量技巧。
2. 測量員訓練：於研究活動前教導測量員各項儀器之使用方式、注意事項，每一位測量員僅負責同一項儀器之測量，以避免不同測量員技巧上之個別差異，而影響研究之正確性，經練習熟悉後方可執行測量活動。

## 第二節 研究工具與方法

### 一、資料收集與測量方法

(一)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，信度則由前測 75 位 60 歲以上的老人，經過修正後發展成本次研究問卷。由受過營養專業訓練並實習過、且取得營養師執照之研究諮詢人員，進行一對一的面談調查；全程諮詢均由同一諮詢員執行，並由諮詢員當場親自據實填寫問卷，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，1998），以確保受試者回答的正確性。

(二)脈搏、血壓：由心血管彈性檢測儀（Dyna pulse 200m, Pulse Metrics Inc., USA），受試者靜坐休息後，以坐姿進行測量。

### (三)身體組成分析、骨質分析

1. 身體組成分析：受試者測量身高後即進行身體組成之測量。在室溫（~26℃）下，於攝食及運動三小時後，藉由身體組成分析儀（segmental bioelectrical impedance analyzer, SBIA, InBody 3.0, Biospace Co., Ltd., Korea）測量，受試者穿著寬鬆的衣著，除去附件及飾品，並脫去鞋、襪進行測量，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（以免碰觸身體影響到測量之準確性），四肢計有八段與傳導器接觸，以進行測量。測量項目：總體重、除脂體重（fat-free mass, FFM）、

脂肪重 (fat mass, FM)、肌肉重 (muscle mass, MM)、身體總水重 (total body water, TBW)、骨量 (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 (triceps skinfold thickness, TSF)。

2. 骨質分析：跟骨廣頻超音波衰減率 (calcaneus broadband ultrasound attenuation, BUA) 由超音波骨質分析儀 (CUBAClinical, McCue, Hampshire, England) 測定，受試者脫去鞋、襪，坐於有靠背之椅子，由測量員依照受試者腳掌長度選擇踏板，受試者將腳靜置於踏板上，由測量員在腳踝內、外兩側、跟骨下方塗傳導膠，測量單腳後，換腳再測。

#### (四) 握力、腳力測量

1. 握力：握力之測量則藉由握力器 (GRIP D, Takei, Japan) 進行之，受試者直立，單手輕握著握力器自然下垂、微離軀幹，由測量員發令，受試者隨即一次用力握到底，測量時勿須閉氣，測量範圍 0~99.9 公斤，精確度至 0.1 公斤，測量後換手再測，每一手均測兩次後取最大值。
2. 腳力：睜眼及閉眼單腳站立以碼錶測量時間，測量時，受試者不可移動，雙手插腰，抬起的腳不可碰觸地面或勾另一腳，該腳落地即停止計時，換腳再測。

#### (五) 採血、取尿

1. 採血：受試者需空腹 8 小時以上，由領有護士執照的專業人員進行，全程僅採血一次，約 5~6 ml，分別收集於 EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid) 真空管 2~3 ml、Sodium heparin 真空管 2~3 ml。

收集到的血液，除含有 EDTA 的血液樣本外，離心 15 分鐘 (150×g, 室溫), 取出上層液, 分裝儲存於 -70 , 留待分析。

2. 取尿：事前提供免洗杯及集尿管給受試者帶回，於活動當日收集早晨起床後第一次如廁之尿液，前、後段尿液不要，由受試者收集後繳回，儲存於 -20 凍箱，留待分析。

## 二、實驗樣品分析

### (一) 血漿

1. 胺基酸：Glutamine , Alanine , Valine , Isoleucine , Leucine , 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 0.0146g 之 Glutamine 以二次蒸餾二次去離子水定容至 25ml (distilled diionized water, d. d. water) , 濃度 4μmole/ml。
- b. Alanine , Valine , Leucine , f-Tryptophan 之 stock 標準液：將 0.0089g Alanine, 0.0117g Valine, 0.0131g Leucine, 0.0204g f-Tryptophan 分別以 20mMHCl 定容至 25ml , 濃度 4μmole/ml。
- c. Isoleucine 之 stock 標準液：將 0.0131g 之 Isoleucine 以 20mMHCl 定容至 50ml , 濃度 2μmole/ml。
- d. 移動液：EluetA (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 Fluor Borate Buffer 1 (AccQ 1)、  
AccQ Fluor Reagent Powder 2A (AccQ 2A)、  
AccQ Fluor Reagent Diluent 2B (AccQ 2B) (Waters  
Corp., USA)

(2) HPLC：

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

(3) 步驟：

- a. 配製衍生試劑：乾熱器 (Barnstead/Thermolyne dri-bath,  
DB28125, USA) 預熱至 55℃，將 AccQ 2A 試劑之  
粉末完全振盪至瓶底，先以 1ml AccQ 2B 試劑潤濕  
微滴管，再另取 1ml AccQ 2B 試劑加入 AccQ 2A  
瓶中，充分混合使之均勻溶解，將 AccQ 2A 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 血漿胺基酸混和標準液中各胺基酸 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
valane	110	350	450	600
Isoleucine	75	220	400	600
leucine	90	175	250	350
tryptophan	15	50	125	200
d. d. water	4185	3055	1900	750
總體積 ( μl )	5000	5000	5000	5000

c. 血漿回溫，離心 (  $1000\times g$  , 10 , 20min ) 後，取上層液 100μl，與 100μl 之 20mM HCl 混勻後 ( 以變性沈澱血漿內之蛋白質，避免干擾待分析游離胺基酸之測量 ) 放入微量過濾離心管 ( ultrafree-MC, UFC3LGC00, Millipore, USA )，再超高速離心 6.5 分 ( 桌上型超高速微量離心機，MicroCen13, Herolab, Germany )。

d. 離心後，取下層液 20μl 進行衍生，以 AccQ TAG 方法，經 HPLC 測定六種胺基酸之血漿濃度。

2. 空腹血糖：以 Glucose oxidase 方法測定 ( Beckman LX20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, California, USA )。

3. 全血細胞計數 ( Complete blood count, CBC )：以 Radio frequency and Direct current method 測定 ( Sysmex Se-9000,

Sysmex Corp., Kobe, Japan) , 測定項目包括血小板、紅血球、血色素、血比容、平均血球體積、平均血紅素、紅血球平均血紅素濃度、白血球、淋巴球、中性球、單核球、伊紅性球、鹼性球。

## (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 0.0131g 之 HP 以 20mM HCl 定容至 50ml, 濃度 2 $\mu$ mole/ml。
- b. 3-MH 之 stock 標準液: 將 0.0169g 之 3-MH 以 20mM HCl 定容至 25ml, 濃度 4 $\mu$ 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 $\times$ 150mm (AccQ Tag, Waters Corp., USA), 管柱溫度 37 $^{\circ}$ C, 流速 1.0ml/min, 以螢光激發波長 250nm、放射波長 395nm 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 尿液胺基酸代謝物混和標準液中各胺基酸代謝物 stock 標準液之取量( $\mu\text{l}$ )\*

	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 ( $\mu\text{l}$ )	5000	5000	5000	5000

\*HP: Hydroxyproline; 3-MH: 3-Methylhistidine.

c. 尿液回溫，離心 ( $700\times g$ ， $10^\circ\text{C}$ ，20min) 後，取上層液  $100\mu\text{l}$ ，與  $300\mu\text{l}$  之  $6\text{NHCl}$  混勻，於  $110^\circ\text{C}$  烘箱水解 3.5 小時，使 HP 分解成游離狀態，回溫後混勻、離心 ( $700\times g$ ， $10^\circ\text{C}$ ，20min)。

d. 離心後取上層液  $20\mu\text{l}$  真空乾燥 (Vacuum Station, Millipore Corp., USA) 後，以  $20\mu\text{l}$  之  $20\text{mMHCl}$  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。

2. 尿中 Creatinine (Crt)、尿液尿素氮 (urinary urea nitrogen, UUN) : Crt 以 Jaffe Reaction 方法測定 (Beckman LX20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, California, USA)，其原理是利用 Crt 會與鹼性苦味酸 (alkaline picrate) 進行呈色反應，以定量 (Booth, Naidoo, Rosenberg & Kainer, 1999)。UUN 以 Conductivity 方法測定 (Beckman LX20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, California, USA)，其原理是利用 UUN 在水中分解形成離子態，將兩片等面積之白金電板

放入待測溶液、通電後，溶液中正、負離子分別吸附在通負、正電的白金電板上，如此在兩白金板間形成一電橋，電橋的強度即為 Conductivity，其與待測物之濃度成正比 (Georgobiani, Volkov & Vorob'ev, 2002)。

3. 尿液酸鹼值：經由酸鹼值離子測定儀 (Ion analyzer M-3000, Suntex Corp., Indianapolis, In, USA) 測定，步驟如下：
  - (1) 尿液回溫後，混勻。
  - (2) 測定儀經標準液校正後，進行尿液酸鹼值之測定。
  - (3) 全部樣本測量完一次後，再測第二次，取兩次之平均值。
  
4. 尿鈣：經由原子吸收光譜儀 ( Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS; AA-660, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan ) 測定。
  - (1) 試劑：
    - a. 2% 氯化鑷 ( $\text{LaCl}_3$ ) 溶液。
    - b. 鈣之 stock 標準液 (1000ppm; J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N. J., USA)。
  - (2) 步驟：
    - a. 鈣之 stock 標準液以 d. d. water 稀釋成 10、40、80、100、150、200ppm (此為參考標準液，供標準曲線之製作)。
    - b. 0.1ml 離心 (  $250\times g$ , 10 , 20min ) 之尿液上層液與 5ml 氯化鑷溶液 (2%) 稀釋混勻後，再離心 (  $150\times g$ , 10 , 20min )，以 AAS ( AA-660 ) 參考標準曲線測定尿鈣之濃度。

### 第三節 統計分析

由 SAS 統計套裝軟體( 9.0 版, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA ) 分析, 以 One Way ANOVA 處理所有之數據, 再以 Duncan's New Multiple Range Test 統計各項食物攝取份數、脈搏、血壓、身體組成、骨質密度、握力、腳力、尿液及血液生化檢驗各項指標, 並比較各項平均值之顯著差異 ( $p < .05$ ), 以平均值±標準差 (mean ± SD)、百分比 (Percentage) 表示。以簡單迴歸分析 (Simple regression analysis) 了解各項指標之間之相關性。