

第參章 研究方法與步驟

本章主要在敘述整個實驗過程以及資料的處理方式，包括：一、研究對象，二、研究流程與步驟，其中又細分實驗流程、儀器校正與設備檢視、受試者注意事項、最大攝氧量測量、運動訓練及兒茶素的補充及血液抽取及分析，三、資料統計與分析。

第一節 研究對象

本研究以 40 名自願健康男性為研究對象，受試者以大學學生為主。實驗前均被告知了解實驗目的及過程，並填寫受試者須知（附錄一）與同意書（附錄二），及健康情況調查表（附錄三）。

第二節 研究流程與步驟

本研究採獨立樣本設計，以 40 名健康男性為受試者。以隨機的方式，分配到控制組(C)、補充組(S)、訓練組(E)及訓練+補充組(E+S)等四組中(每組 10 名)，其中訓練組和訓練+補充組，必須接受每週 3 次每次 20 分鐘的跑步機訓練，其運動強度為 75% 的 VO_2R ，補充組和訓練+補充組，則接受連續四週的 catechin 補充。分別在訓練前、訓練後立即及運動後 24 小時抽取肘靜脈血分析。

一、實驗流程：

1. 運動測試及分組(準備期)

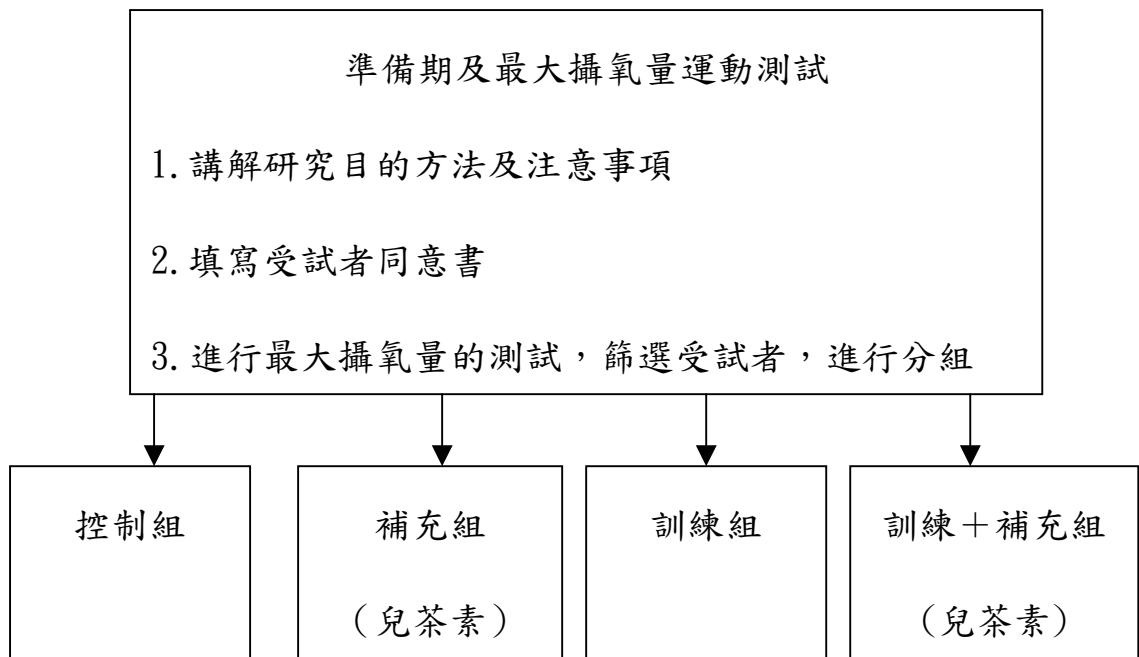
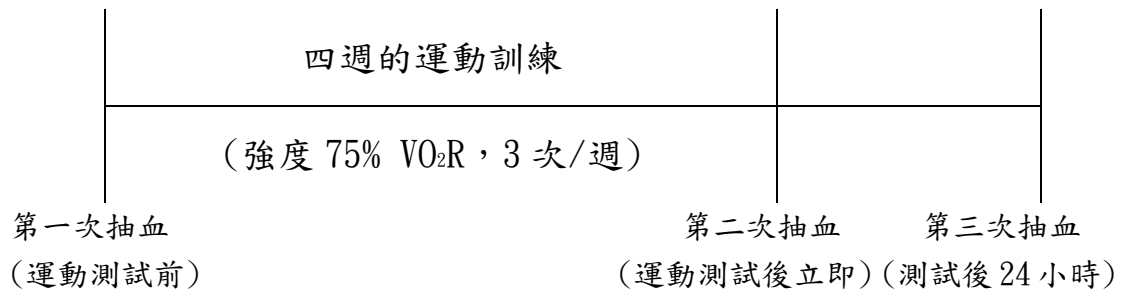


圖 3-1 運動測試及分組

2. 抽血的時段及流程

(1) 訓練組及訓練+補充組



(2) 控制組及補充組

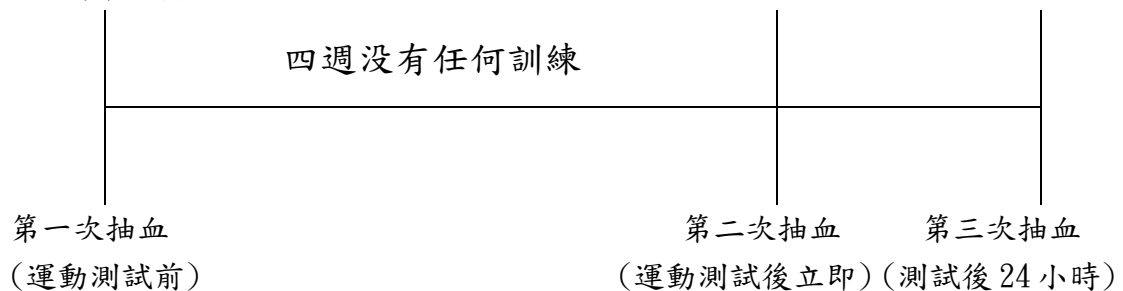


圖 3-2 抽血時段及流程

3. 實驗流程

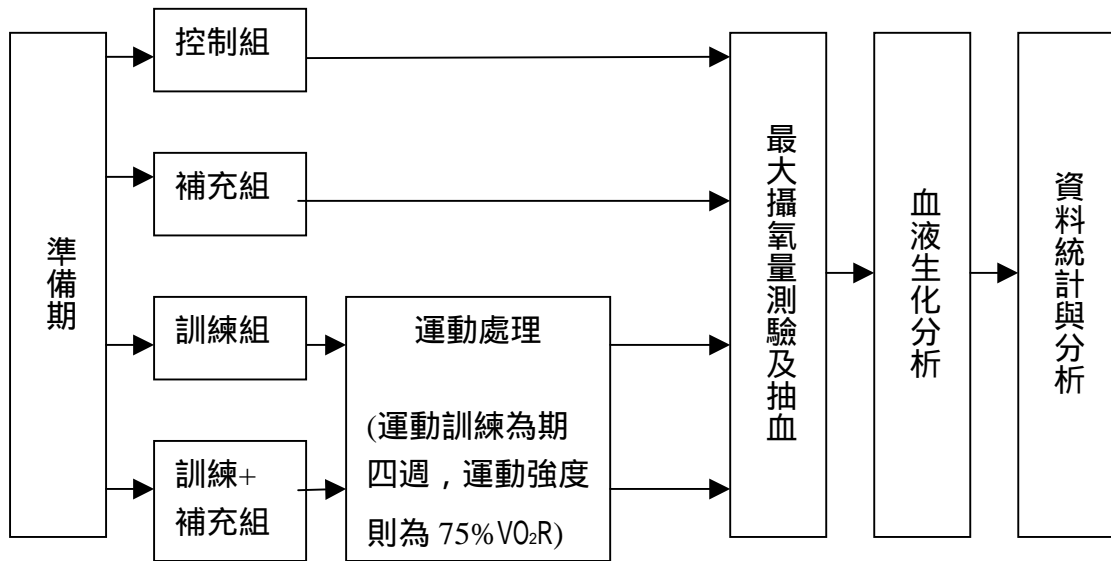


圖 3-3 實驗流程

二、儀器校正與設備檢視

1. 能量代謝系統

Vmax 29 型電腦能量代謝測量系統，Sensormedics 公司(美國)所製造的 Vmax 29 型電腦能量代謝系統 (Metabolic Measurement Cart)，使用前以標準氣體進行校正分析，確定氧和二氧化碳的含量比例，再依操作手冊程序進行氣量之比對和系統之測試。

2. 心跳率記錄器

本研究使用美製 Medexcel 四頻道遙測心電圖記錄器，並搭配 Vmax 29 型電腦能量代謝測量系統，記錄受試者最大攝氧量實驗過程的心跳反應，直接記錄於系統資料庫。

3. 跑步機 (treadmill)

本研究使用 Quinton65 型原地跑步機及 645 型跑步機微電腦控制器。檢測跑步機在固定速度下，所移動的水平移動

距離是否與單位時間所測得的相符合。再依照操作手冊的方法與程序，來設定本研究的實驗步驟。

4. 實驗環境記錄

實驗室內的溫度、濕度及氣壓隨時注意。在運動測驗前，將所測得的溫度、氣壓資料，輸入能量代謝系統中，以便作為氣體校正的參考值。實驗進行時溫度控制在 20-22 °C，大氣壓力為 756-762 mmHg。

三、受試者注意事項

實驗前發給每位受試者一份受試者須知及同意書，並向受試者說明有關研究目的、過程及回答相關問題，同時要求受試者在同意書上簽名，表示願意參加本實驗。測驗當天再向受試者詳述測驗程序、方法及有關細節，實驗期間隨時回答受試者的疑問，並要求受試者：

- (1) 在實驗前二十四小時內不得參加任何激烈運動。
- (2) 實驗期間應保持平常飲食習慣。
- (3) 在指定時間前穿著運動服裝到達實驗室。

四、最大攝氧量的測驗

1. 基本資料

受試者必須於施測前三十分鐘完成身高、體重、安靜心跳率、安靜攝氧量等基本資料的記錄。

2. 心電圖的安裝（測量心跳率）

先用酒精擦拭受試者胸骨柄的上端（負極）、左側第五肋骨和左鎖骨中央向下垂線之交點（正極），將電極由導線接至心電圖無線電發報器，在將無線電發報器以皮套固定在受試者身上，檢視心電圖顯示器的訊號是否正確出現在電腦

螢幕上，心跳率自動與 Vmax29 型電腦能量代謝系統連線。

3. 採氣裝置

將採集氣體專用面罩罩住受試者的口鼻，再將呼出之氣體透過蛇管連接到 Vmax29 型電腦能量代謝系統之氣體入口。運動開始後每隔 20 秒由 Vmax29 系統自動採氣並分析、列印。

4. 運動測驗

受試者於正式運動訓練前二週，於實驗室中，利用能量代謝系統及電動跑步機來測得個人的最大攝氧量值。運動測量方式，則以 Bruce 法測驗程序(Brooks 等人，2000)為依據。如下表所示：

表 3-1 修正 Bruce 測驗程序表

強度(哩/小時)	坡度(%)	持續時間(分鐘)
1.5	5	3
1.7	10	3
2.5	12	3
3.4	14	3
4.2	16	3
5.0	18	3

5. 運動自覺量表(RPE)

將 RPE 製成掛圖置於受試者正前方，受試者以手指示意 RPE 指數。

6. 最後，根據根據測量的結果配合下列 VO_{2max} 的判定基準（達到下列五項中的任三項，則視為達到 VO_{2max} ），判定受試者的 VO_{2max} 。

- (1) 當運動量增加時，攝氧量並無明顯增加。
- (2) 每分鐘換氣量超過 100 升。
- (3) 呼吸交換率在 1.1 以上。
- (4) 心跳率在最大預測值 ± 10 次 / 分範圍。
- (5) 運動強度自覺量表指數在 19 或 20。

7. 最大攝氧量測驗流程圖

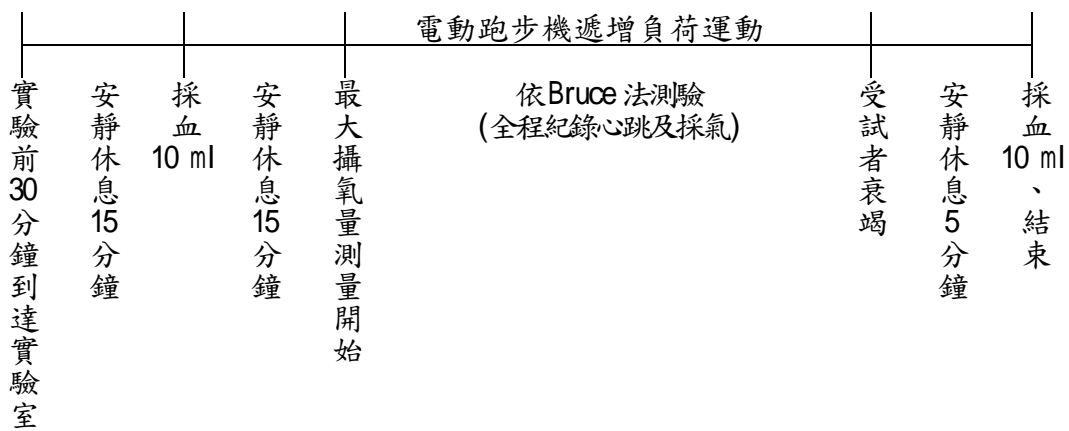


圖 3-4 最大攝氧量測驗流程圖



圖 3-5 最大攝氧量測驗

五、運動訓練及補充兒茶素

40 名受試者依隨機分配，共分為控制組 (C)、補充組(S)、訓練組(E)、訓練+補充組(E+S)等四組。運動組及運動+補充組，則分別完成每週 3 次，運動強度分別為 75% VO_2R ，持續 20 分鐘的跑步機訓練。運動+補充組及補充組則每天補充 500mg catechin(綠恩生物科技公司，台北)，共計四週。



圖 3-6 抗氧化補充劑-兒茶素

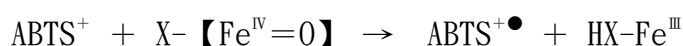
六、血液樣本的採集及分析

本研究的實驗過程及血液採集，均有合格的醫護人員在場，每位受試者在訓練前、後，各由合格護士在其肘前靜脈抽血 10 ml，分別注入含有抗凝血劑(EDTA)和不含抗凝血劑試管中，待全部血液樣本收集完成後，再一併分析。

(一)總抗氧化狀態測量(total antioxidant status, TAS)

血漿中有許多具有抗氧化能力的物質，如白蛋白(albumin)、尿酸(uric acid)、維生素 C、維生素 E、 β -胡蘿蔔素(β -carotene)、麩胱苷肽(glutathione)、含-SH 基物質，故可以血漿中總抗氧化狀態(total antioxidant status; TAS)值代表血漿中所有具抗氧化能力的物質總和。本實驗以市售試劑組(NX2332, Randox, Randox Laboratories Ltd., Antrim, UK)測定之。

1. 利用 enzyme kinetic (酵素動力學) 原理，取 2ml 已離心的血漿，以 COBAS MIRA PLUS 自動分析儀分析，並與酵素組合試劑(Randox, Lab-Ltd., 英國製)，試劑調配如下：
(1)chromogen(發色劑)+10ml 緩衝液；(2)standard+1ml double deionized water；(3)control+10ml ddH₂O，混合後分析 TAS 濃度。
2. 原理為：將 ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 與過氧化(peroxidase)-metmyoglobin 及 H₂O₂ 一起作用，使其產生 ABTS⁺● 自由基，此為一種藍綠色產物，於 600 nm 波長下有最大吸光值(Miller 等人, 1993)。因此於樣品中添加不同濃度的抗氧化劑，則會有不同程度抑制藍綠色物質的產生，故而可藉由此方式來評估血漿中的總抗氧化狀態。其反應如下：



於實驗前需將所有試劑於 37°C 下回溫，將血漿檢體、標液與去離子水(去離子水作為空白實驗用)各取 20 μ L，

加入 1 mL 色素原 (chromogen) 混合均勻後，在 600 nm 波長下讀取最初之吸光值 (A1)。再加入 200 μ L 受質試劑 (250 μ mol/L H_2O_2)，在 37°C 之水浴中反應 3 分鐘，再次於 600 nm 波長下測其吸光值 (A2)，為避免複合物消失，須於 30 分鐘內完成測定。計算吸光值差 (ΔA ， $\Delta A = A2 - A1$)，將血漿檢體所得之吸光值差與標準溶液之吸光值差的比值與標準液濃度相乘，即可求得檢體中之總抗氧化能力。

3. 分析時儀器的各項參數設定：如附件四。



圖 3-7 COBAS MIRA PLUS 自動分析儀

(二) 血清激酸肌酶 (creatine kinase, CK)

CK 存儲於肌肉之中，幫助能量的合成，在正常的狀況下 CK 會穿透過細胞膜，而進入到血液當中，在肌肉受到創傷時會使血中的 CK 值升高，所以本研究以血漿中的 CK 濃度來作為判斷肌肉傷害的指標。

1. 抽血所得血液經離心處理後，與酵素組合試劑 (Randox, Lab-Ltd., 英國製) 混合，並以 COBAS MIRA PLUS 自動分析儀分析(圖 3-7)。

2. 原理：



3. 分析時儀器的各項參數設定：如附件五。

(三) 血漿中脂質過氧化物(MDA) 測定分析

1. 當動、植物的體內發生氧化傷害時，其細胞膜上的脂質就會產生過氧化作用，而產生脂質過氧化物，如：malondaldehyde (MDA)，故脂質過氧化物濃度可做為氧化傷害的指標。本實驗採市售試劑組 (CAT. No. 437634, Calbiochem., Calbiochem-Novabiochem Cor., La Jolla, CA) 進行分析。2. 測定原理為：於血漿中加入 Reagent R1 (7.7 mM N-methyl-2-phenylindole, in acetonitrile) 後，會與 MDA 或 4-HNE 於 45°C 下反應產生 chromophore，此物質於 586 nm 波長下有最大吸光值 (Esterbauer 等人，1990)。

先將 Reagent R1 以三倍體積之 100% methanol 稀釋，取 200 μ L 標準液或血漿檢體，加入 650 μ L 稀釋過的 Reagent R1，震盪混合 4 - 5 秒後，加入 150 μ L Reagent R1 (15.4 M methansulfonic acid)，再將之混合均勻。於 45°C 下反應 40 分鐘後立刻冰浴中斷反應，以 586 nm 波長下測其吸光值。將檢體所測得之吸光值與 MDA 之標準曲線相對照，即可得到 MDA 之濃度。

3. 分析儀器(Maker: Spectronic Unicam)：



圖 3-8 GENSYS10 series Spectro Photometer

第三節 資料統計與分析

實驗測量所得之各項資料，以電腦 SPSS 統計軟體，分別進行如下之統計分析：

- 一、以混合設計二因子變異數分析(two-way ANOVA)，考驗四組（控制組、補充組、訓練組、訓練+補充組），於不同時段

所測得各項變項(TAS、MDA、CK)之間的差異性。

- 二、以混合設計二因子變異數分析，考驗四組於訓練前及訓練後衰竭時間和最大攝氧量間的變化。
- 三、若二因子變異數分析有交互作用，以單純主要效果來進行分析，若達顯著，再以杜凱氏 (Tukey) 法進行事後比較。
- 四、本研究中以 $\alpha = .05$ 為顯著水準。