

國立臺灣大學生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

以人類尿液代謝體及生化指標變化探討蔬菜特徵
之攝食研究

Vegetable signatures derived from human urinary
metabolomic data and change of biomarkers
in a controlled feeding study

陳鳳玲

Fong-Ling Chen

指導教授：潘文涵 博士

Advisor: Wen-Harn Pan, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July 2012



中文摘要

研究背景與目的：過去已有許多研究指出，攝取植物性食物，例如蔬菜、水果、全穀類以及黃豆製品，能降低慢性疾病的發生率。然而其對人體整體代謝型態的影響機制尚不明確，需要更多研究來瞭解。代謝體學主要研究的標的物為生物體內的所有或是特定小分子代謝物，藉由探討這些代謝物的變化，能夠幫助我們更加了解人體代謝受到影響時的變化情形。本研究挑選了文獻中指出具有生理活性的五種蔬菜，設計一個適合的短期攝食研究，觀察生化指標變化，並利用代謝體學的方式來找出個別蔬菜組中具有獨特性的代謝物變化型態。

實驗方法：本研究招募 10 位受試者，於臨床試驗中心進行一個短期攝食研究。試驗觀察期為 1 天，評估空腹、午餐前以及午餐後固定時間，其血壓、生化值以及代謝體的改變。每次試驗之間至少有 5 天的沖淡期，以確保試驗不同時間點之間不會互相影響。實驗組每次提供一種蔬菜 200g，再加上一組對照組，共進行六次試驗。挑選蔬菜分別為菠菜、芹菜、山苦瓜、甜菜根以及洋蔥。

結果：比較各試驗蔬菜組與對照組，發現在血壓、血糖以及血脂的變化，分別於餐後不同的時間，達到統計顯著差異。主成分分析結果顯示，空腹時所有的代謝型態皆為較相近，而午餐前與部分蔬菜組的午餐後 2 小時內為另一個群集，其餘的餐後時間點則隨著時間的推進，逐漸向空腹點靠近。整體而言，看到尿液的代謝體隨著代謝反應出現一個時間循環。同時利用變異數分析與多重比較，可在個別蔬菜組中挑選到具有獨特性的代謝物。

結論：以目前所建立的方法流程，我們確實能夠挑選出在各種蔬菜當中具有獨特性的物質，當作這些蔬菜的攝取指標，但仍需要更多分析將這些物質加以分類以進行鑑定，進一步找到與生理活性相關的代謝途徑。

【關鍵詞】：代謝體學、尿液、蔬菜、植化素



Abstract

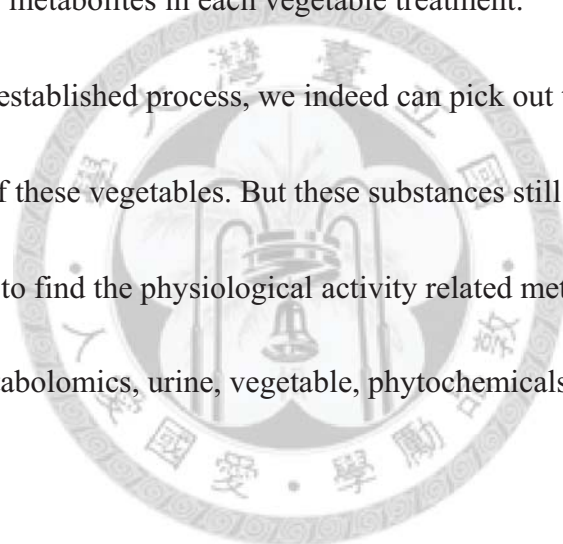
Background and objective: Many studies have been pointed out that the intake of plant foods such as vegetables, fruits, whole grains and soy products can reduce the incidence of chronic diseases. However, the mechanism of its effect on human metabolic pattern is still not clear, and need more research to understand. Metabolomics is a systematic study which focuses on all or specific small molecule metabolites in a biological system, by exploring these metabolite changes can help us to understand the variations in human metabolism when the system is affected. This study selected five vegetables that have been reported with physiological activity and designed a suitable short-term feeding study to observe the changes in biomarkers. Moreover, we used metabolomic analysis to explore the specific metabolic changes in different vegetables.

Method: A feeding study of 10 subjects was admitted to a clinical research center. The observation period was 1 day, to assess the blood pressure, biochemical values and metabolite changes at fasting, before lunch, and the time-point after lunch. There's a washout period with 5 days between each test, to ensure no interaction of each test. The study included 6 groups: 5 experimental groups that provided 200 g vegetable at each time, and a control group without vegetable. The test vegetables were spinach, celery, wild bitter gourd, beetroot and onion.

Results: Comparing experimental groups with control group, we founded a significant difference in blood pressure, blood glucose and blood lipid changes. All fasting metabolic patterns were similar, and the pattern at before lunch and 2 hours after lunch can be clustered, the rest of the postprandial time points as time go on and gradually near to the fasting point. Overall, we can see the change in metabolite is time cycle in urine with PCA analysis results. Also, using ANOVA analysis and multiple comparisons, we can select specific metabolites in each vegetable treatment.

Conclusions: In this established process, we indeed can pick out the specific metabolite as an intake marker of these vegetables. But these substances still need to be classified for identification and to find the physiological activity related metabolic pathways.

【Key words】 : metabolomics, urine, vegetable, phytochemicals



目錄

中文摘要	i
Abstract.....	ii
目錄	iv
圖目錄	v
表目錄	vi
第一章 緒論	1
第一節 前言	1
第二節 蔬果的健康效益	2
第三節 植化素	3
第四節 試驗蔬菜	4
第五節 代謝體學	7
第二章 實驗方法	9
第一節 研究設計	9
第二節 試驗對象	9
第三節 試驗飲食	10
第四節 檢體及資料收集	12
第五節 尿液代謝體分析	13
第六節 統計分析	17
第七節 代謝物鑑定	19
第三章 結果	20
第一節 受試者空腹狀態與午餐前基線資料	20
第二節 攝食蔬菜對血壓及一般生化值的影響	20
第三節 攝食蔬菜對尿液代謝體的影響	22
第四章 討論	56
第一節 試驗設計與方法	56
第二節 目前結果	59
第三節 各組挑選出候選代謝物與其相關文獻	61
第四節 研究限制	66
第五章 結論與未來方向	67
參考文獻	68
附錄	78
附錄一 受試者同意書	79
附錄二 試驗操作手冊	84
附錄三 個案報告表	94

圖目錄

圖 1-1 食物中主要的植化素種類.....	6
圖 2-1 UPLC 條件測試結果。.....	14
圖 2-2 檢體分析流程.....	15
圖 2-3 以總離子層析圖評估測量值信度。.....	15
圖 2-4 質譜資料前處理流程.....	16
圖 3-1 以盒式圖呈現血壓及血液生化值變化趨勢.....	27
圖 3-2 以盒式圖呈現尿液中礦物質變化趨勢.....	30
圖 3-3 血壓於餐後 2、5、7 小時的變化值.....	32
圖 3-4 血糖及胰島素於餐後 2、4、7 小時的變化值.....	33
圖 3-5 血脂於餐後 3、5、7 小時的變化值.....	34
圖 3-6 血液中尿酸於餐後 2、4、7 小時的變化值.....	36
圖 3-7 尿液中礦物質排出量餐後變化趨勢.....	37
圖 3-8 以 PCA score plot 呈現尿液代謝體於 ESI+模式下所偵測到的代謝型態.....	39
圖 3-9 以 PCA score plot 呈現尿液代謝體於 ESI-模式下所偵測到的代謝型態.....	42
圖 3-10 重複測量檢體 (split sample)PCA 結果.....	45
圖 3-11 不同蔬菜於 ESI+模式所測得的所有代謝物與對照組相較之差異顯著.....	46
圖 3-12 不同蔬菜於 ESI+模式所測得的代謝物其滯留時間分布.....	48
圖 3-13 不同蔬菜於 ESI-模式所測得的代謝物與對照組相較之差異顯著.....	50
圖 3-14 不同蔬菜於 ESI-模式所測得的代謝物其滯留時間分布.....	52
圖 3-15 以 PCA 結果呈現經過挑選的代謝物(10 個)於 ESI+模式下其表現型態.....	54
圖 4-1 不同的曲線下面積算法.....	57
圖 4-2 以 3 種不同的曲線下面積算法所得的結果比較 (以 ES+模式結果為例).....	58
圖 4-3 Limonene and pinene degradation pathway.....	64
圖 4-4 Ascorbate and aldarate metabolism.....	65

表目錄

表 3-1 受試者空腹基線資料.....	24
表 3-2 受試者午餐前基線資料.....	25
表 3-3 受試者尿液中礦物質排出量 (空腹基線值).....	26
表 3-4 受試者尿液中礦物質排出量 (午餐前基線值).....	26
表 3-5 代謝物初步鑑定結果.....	55
表 4-1 試驗蔬菜中鉀、鎂以及鈣的含量 (每 100g 精生重).....	60





第一章 緒論

第一節 前言

植物性食物例如蔬果、全穀類以及黃豆製品，一直是健康飲食型態中不可或缺的食材，攝取足量植物性食物除了可維持正常身體機能，預防慢性疾病，還可以改善疾病症狀。根據行政院衛生署所推廣的「天天5蔬果」，指出每天至少要吃3份蔬菜與2份水果，而「每日飲食指南」更是建議每天需攝取蔬菜3~5碟、水果2~4份，然而根據2005~2008年第三次「台灣營養健康調查」的調查結果，國人的攝取蔬果量仍未達理想狀態，可見得繼續提倡蔬果攝取的重要性。富含蔬果的飲食型態除了能夠提供足量的礦物質(例如鎂、鉀)、維生素、膳食纖維等之外，其內含的植化素 (phytochemicals) 也被認為對人體健康扮演著重要角色[1-3]。植化素種類繁多，其許多的生理活性及功能目前尚未定義出來，過去在研究這些物質的功效時，往往侷限在單一物質或是單一食材，然而2003年Liu等學者的研究[1]提出植化素對人體的影響並非單一而是具有協同性，因此，要探討攝取蔬果對人體整體代謝型態的影響仍需要有更適當的方法。

質譜技術的蓬勃發展帶動了代謝體學 (metabolomics) 研究的產生[4, 5]。代謝體學主要研究的標的物為生物體內的所有或是特定小分子代謝物，藉由研究這些物質能夠幫助我們更加了解人體在各種狀態下所呈現的代謝圖譜 (metabolic profile)。不同的物質在體內代謝所呈現的特殊型態可能具有可辨認性，因此這些特殊的型態可被用來作為代謝指紋 (metabolic fingerprint)。

本研究挑選了過去文獻中指出具有生理活性的五種蔬菜，設計一個適合的短期飲食介入試驗並觀察其生化指標，並以代謝體學的方式來探討攝食蔬菜對人體所產生的代謝變化，找出個別蔬菜組中具有獨特性的代謝物。主要目標有二：(1) 建立人體的蔬菜代謝體反應之測量標準流程。(2) 測量使用不同蔬菜後代謝體及血壓之週期變化型態並找出每樣蔬菜特有的代謝反應型態。

第二節 蔬果的健康效益

流行病學指出增加蔬果的攝取量與降低慢性疾病發生有強烈的關聯性，包括癌症、心血管疾病以及腦中風[6]。美國癌症研究中心（American Institute for Cancer Research, AICR）與世界癌症研究基金會（World Cancer Research Fund, WCRF）的報告指出每日攝取超過 400 克蔬果能降低癌症發生率達到至少 20% [7]。而荷蘭 Wageningen 大學的 Pieter van't Veer 教授等人整理超過 250 篇在荷蘭所進行的觀察性研究進行整合分析（meta-analysis），結果顯示增加蔬果攝取能降低癌症發生率達 19%，心血管疾病則是 16% [8]。

攝食蔬果所帶來的健康效益與其營養成分和植化素類型息息相關。動物實驗結果顯示，藍莓所含的多酚類物質（polyphenol）能夠改善神經功能的退化[9]，可能有助於改善阿茲海默症（Alzheimer's disease）以及帕金森氏症（Parkinson's disease）。抗氧化活性物質，例如維生素 C、類胡蘿蔔素（carotenoids）、類黃酮（flavonoids）以及礦物質硒（Se）、鋅（Zn）、含硫化物（sulfur-containing compounds）等，能夠透過減少動脈中膽固醇的氧化達到降低心臟疾病的發生風險[10]。而水溶性纖維則可以幫助降低血清膽固醇達可接受的濃度範圍，同樣有助於預防心血管疾病的發生[11]。Ascherio 等人的研究[12]則指出膳食纖維與礦物質鉀（K）、鎂（Mg）與高血壓罹患風險下降有顯著相關。另一方面，廣泛存在於蔬果的葉酸（folic acid）、維生素 B₆ 以及維生素 B₁₂ 已被研究證實能調節同半胱胺酸（homocysteine）在血液中的濃度，而高同半胱胺酸血症（hyperhomocysteinemia）是已知的心血管疾病危險因子[10]，有此症狀則容易引起動脈硬化。

除了心血管疾病和癌症，攝取蔬果對於憩室症（diverticulosis）[13]、第二型糖尿病（type II diabetes）[14]、慢性阻塞性肺病（chronic obstructive pulmonary disease, COPD）[15]、關節炎（arthritis）[16]、白內障（cataract）[17]的防治也有顯著的益處。

第三節 植化素

植化素 (phytochemicals) 是一種具有生化活性的非營養素物質，主要存在於植物性食物當中，包括蔬菜、水果、豆類、穀類、草本植物、茶以及香料等[11]。目前可被鑑定的種類超過 10,000 種，其功能包括抗氧化[18]、預防發炎反應及過敏[19, 20]、調控血壓[21]、誘導細胞良性分化、輔助其它維生素作用等[22, 23]。植化素的結構與功效息息相關，例如植物類固醇 (phytosterols) 的結構與膽固醇相似，能與膽固醇競爭，降低腸道對膽固醇的吸收[24]。植化素依據其結構與生合成過程可分為：酚類 (phenolics)、萜類 (terpenoids)、生物鹼 (alkaloids) 以及其他 (others) (圖 1-1)。

一、酚類

依據結構可再細分為類黃酮 (flavonoids) 以及非類黃酮 (non-flavonoids) 為蔬果最主要的抗氧化成分，其特色為含有多個氫氧基 (-OH)，可釋出氫離子與活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 產生的自由基，結合以降低體內自由基濃度，預防氧化壓力及老化相關疾病，例如心血管疾病、神經退化疾病等[25]。

二、萜類

以異戊二烯 (isopentadiene) 為單位所組成，植物固醇及類胡蘿蔔素也可被歸為此類。常見於真菌[26]，例如靈芝、牛樟芝，具有抗氧化[27]、抗腫瘤及調節免疫力等功能[28]。目前已知苦瓜成分當中有四種萜類具有 AMPK (AMP-activated protein kinase) 活性，與調節體內血糖汲取的代謝相關，可能為苦瓜降血糖的生理機制[29, 30]。

三、生物鹼

結構上含有氮基，大多為胺基酸的衍生物。例如由 lysine 所衍生的 piperidine

alkaloids與quinolizidine alkaloids。部分植物當中所含的生物鹼具有神經毒性，例如豆科植物[31]。

四、其他

不屬於前三類的植化素皆可被歸於此類，包括一些含硫化合物，例如：蒜素 (alliin)以及硫配醣體 (glucosinolates)。蒜素為 cysteine 代謝衍生物，存在於蔥屬植物當中，具有抗血栓及抗癌功效[32]且為其刺鼻味道的來源[33]。而硫配醣體為十字花科植物的抗癌功效主要成分[34]。

第四節 試驗蔬菜

一、菠菜 (Spinach)

學名為 *Spinacia oleracea* L.。莧科(Amaranthaceae)菠菜屬(Spinacia)，為一至二年年生草本植物。Cao 等人[18]以 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法測量 22 種常見蔬菜的抗氧化能力，菠菜位於第三名僅次於大蒜(garlic)以及芥藍(kale)。菠菜中含有豐富的類胡蘿蔔素[35]、維生素 A、維生素 C 以及鐵質。據本草綱目記載其功效為：通血脈、開胸膈、下氣調中、止渴潤燥。

二、山苦瓜 (Wild bitter gourd)

學名為 *Momordica charantia* L. var. *abbreviate* Ser. 屬葫蘆科(Cucurbitaceae)苦瓜屬(Momordica)，一年生蔓性攀緣草本作物。山苦瓜對於控制肥胖、降低血脂、調節血糖，並可藉由抑制胃幽門螺旋桿菌以預防胃潰瘍發生[36]。內含特殊胜肽 polypeptide-P[37]及多種型態的 cucurbitane-type triterpenoids[38-41]可能為其功效來源的主要成分。

三、甜菜根 (Beetroot)

學名為 *Beta Vulgaris* L. ssp. *Vulgaris*，莧科(Amaranthaceae)莧菜屬(Beta)一年生或二年生草本。含有大量 betalains 及其他的抗氧化成分，例如 cyclo-dopa-glucoside, hydroxycinnamic acids 以及其衍生物[42-44]。甜菜根被認為是富含硝酸鹽 (nitrate) 蔬菜，硝酸鹽在人體內經由口腔中的細菌還原為亞硝酸鹽 (nitrite)，進一步於胃中的酸性條件下再次進行還原反應，產生一氧化氮 (NO)進入血液循環，使血管舒張達到血壓下降，並且可以保護因缺血-再灌注(ischemia-reperfusion)所誘發的內皮細胞損傷[45]。

四、洋蔥 (Onion)

學名為 *Allium cepa* L.，蔥科(Alliaceae)蔥屬(*Allium*) 植物。Diallyl sulfide 以及 allyl methyl trisulfide 是蔥屬植物中常見的含硫化物，研究顯示其功效包括：抑制細胞增生、增強免疫系統、改變致癌物活性、活化去毒性(detoxification)酵素、以及減少致癌物質與 DNA 結合[46]。而有機硫化物 3-mercapto- 2-methylpentan- 1-ol (3-MP) 在細胞實驗中證實可有效抑制過氧亞硝基(peroxynitrite radical 的產生)[47]。

五、芹菜 (Celery)

學名為 *Apium graveolens* L.，傘型科(Apiaceae)芹屬(*Apium*)，為一至二年生草本植物。芹菜中富含 terpenoids 和 flavonoids [10, 48]。而過去動物實驗證實由芹菜所萃取的芹菜素(apigenin)能夠阻斷鈣離子通道，抑制細胞內鈣離子濃度增加[49]，以達到降低血壓的效果。而芹菜籽當中所含的 3-n-butyl phthalide 也具有降血壓及促進血液循環的功效[50]。

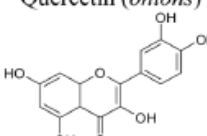
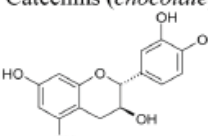
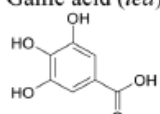
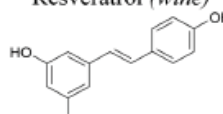
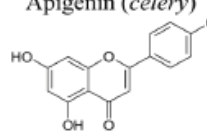
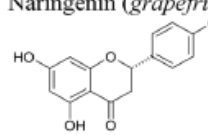
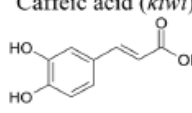
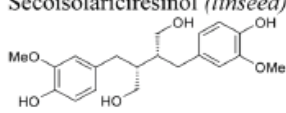
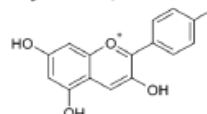
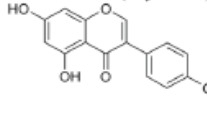
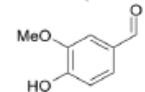
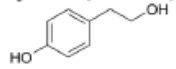

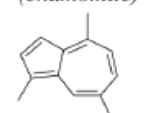
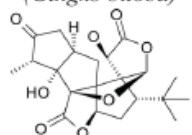
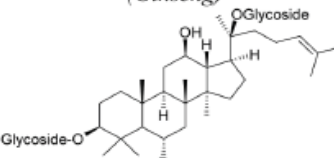
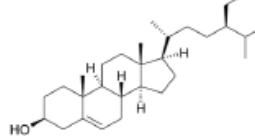
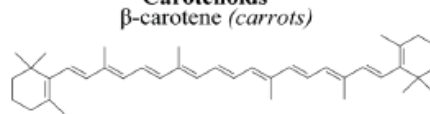
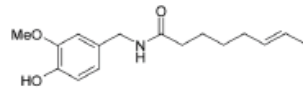
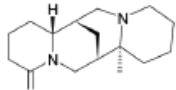
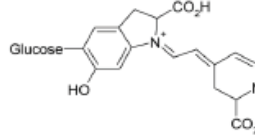
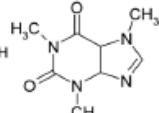
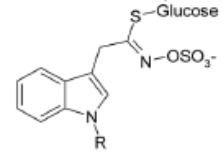
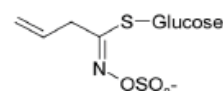
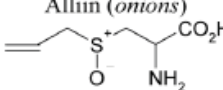
P H E N O L I C S	FLAVONOIDS		NON-FLAVONOIDS	
	Flavonols Quercetin (<i>onions</i>) 	Flavanols Catechins (<i>chocolate</i>) 	Hydroxybenzoates Gallic acid (<i>tea</i>) 	Stilbenes Resveratrol (<i>wine</i>) 
	Flavones Apigenin (<i>celery</i>) 	Flavanones Naringenin (<i>grapefruit</i>) 	Hydroxycinnamates Caffeic acid (<i>kiwi</i>) 	Lignans Secoisolariciresinol (<i>linseed</i>) 
Anthocyanins Cyanidin (<i>blackberry</i>) 	Isoflavones Genistein (<i>soybean</i>) 	Phenolic aldehydes Vanillin (<i>vanilla</i>) 	Phenolic alcohols Tyrosol (<i>olive oil</i>) 	
T E R P E N O I D S	Monoterpenes C₁₀ Thymol (<i>thyme</i>) 	Sesquiterpenes C₁₅ Chamazulene (<i>chamomile</i>) 	Diterpenes C₂₀ Ginkgolides (<i>Ginkgo biloba</i>) 	Triterpenes C₃₀ Ginsenosides (<i>Ginseng</i>) 
	Phytosterols Sitosterol (<i>sunflower oil</i>) 		Carotenoids β-carotene (<i>carrots</i>) 	
A L K A L O I D S	Phenolic amide alkaloids Capsaicin (<i>chili pepper</i>) 	Quinolizidine alkaloids (+)-Lupanine (<i>lupin</i>) 	Betalains Betanin (<i>red beet</i>) 	Purine alkaloids Caffeine (<i>coffee</i>) 
	Glucosinolates Indolyl-glucosinolates Glucobrassicin (<i>broccoli</i>) 		Aliphatic glucosinolates Sinigrin (<i>black mustard</i>) 	
N I T R ~ S U L F U R ~ N D S			S-Alkyl cysteine sulfoxide derivatives Alliin (<i>onions</i>) 	

圖 1-1 食物中主要的植化素種類[51]

第五節 代謝體學

一、起源及名詞定義

代謝體 (metabolome) 一詞即為生物體內所有小分子代謝物的總稱，其概念於 1998 年開始被提出[52, 53]，其來源包含為細胞或組織產生的內生性代謝體 (endogenous metabolome)、消化道菌群產生的微生物代謝體 (microbial metabolome) 以及異物質代謝物 (xenometabolome)，例如藥物或食物代謝產生的物質[54, 55]。

而代謝體學 (metabolomics/metabonomics) 的概念，最早可追溯於古希臘，當時的學者 Ullrich Pinder 制定了“urine charts”用來連結尿液的顏色、氣味及滋味與其生理狀態[56]。英國倫敦帝國大學分子生物學家 Jeremy Nicholson 於 1999 年將代謝體學(metabo“n”omics)定義為：生物系統對生理和病理刺激以及基因改變產生之代謝反應的定量測定[57]。Metabo“n”omic 一詞常用於毒物或藥理等研究領域[58, 59]，分析工具以核磁共振儀 (NMR) 為主，屬於較整體的、系統性的觀察代謝體的改變[60]。而目前較廣泛使用的代謝體學 (metabo“l”omics) 定義為：對於一個生物體內所有代謝物進行全面性的定性或半定量分析[61]。

二、發展與應用

代謝體學分析方法主要可分為兩種策略：非標靶型分析 (non-targeted analysis) 以及標靶型分析 (targeted analysis)，前者主要著重在於代謝體整體的表現型態，例如疾病的診斷[62]或是生物性指標(biomarker)的搜尋，例如 Heinzmann 等人的研究[63]，指出尿液中所排出的 proline betaine 能夠當作攝取柑橘類植物(citrus)的指標，而後者則是針對特定目標進行分析，例如以體內所有脂質代謝相關小分子進行脂質代謝體學的研究[64]。

三、分析方法

代謝體學常用來進行物質分析與鑑定的儀器，包括核磁共振光譜(nuclear magnetic resonance, NMR)以及質譜儀 (mass spectrometer, MS)。NMR 雖能提供較快速的分析且有較好的定性結果，其敏感度則相對較低，濃度較低的小分子，如植化素以及維生素，可能會無法被偵測[65]。而 MS 常見搭配氣相層析儀(gas chromatography, GC)或液相層析儀(liquid chromatography, LC)以達到一個較好的分離效果以協助物質的鑑定工作，然而缺點是實驗耗時較長，且儀器需長時間運作，訊號容易有不穩定的狀況。

代謝體資料特性複雜，除了因實驗設計所誘發產生的變異(induced biological variation)，而體內代謝物本身濃度變異也會影響分析結果，因此由儀器所輸出的原始資料並不能直接用來探討。所有數據需先經過統計品質管制 (quality control) 和前處理 (processing)，刪除品質不佳的數據，並同時將體內的代謝物濃度資料標準化 (normalization)，以達到統計上的可比較性[66, 67]。之後依據研究目標進行統計分析，例如可利用主成分分析法(principal component analysis, PCA)、偏最小平方判別分析法(partial least-squares discriminate analysis, PLS-DA)於部分可被鑑定的物質，以進行資料分群或區別分析[68-71]。

第二章 實驗方法

第一節 研究設計

本研究為一個短期飲食介入試驗 (feeding study)，欲探討攝取蔬菜對人體代謝體的影響。試驗觀察期為 1 天，每次試驗之間至少有 5 天的沖淡期 (washout period)，以確保試驗之間不會互相影響。每次試驗提供一種蔬菜，於 2011/07/02 至 2011/08/06 共進行六次試驗，其中一次為不含蔬菜的對照組 (control group)。試驗進行流程為：菠菜組 (7/2)、芹菜組 (7/9)、對照組 (7/16)、山苦瓜組 (7/23)、甜菜根組 (7/30) 以及洋蔥組 (8/6)。

在試驗觀察期的前一天，受試者僅能食用本研究所提供的標準化飲食 (standardized diet, STD diet)，包含早餐、午餐以及晚餐，其餘飲料、食物一律禁止，飲用白開水則無限制。標準化飲食會以冷凍宅配的方式提前一天送至受試者家中，受試者自行以電鍋加熱後，即可食用。因隔日早上需抽取空腹血液，因此晚上 10 點後需配合禁食。試驗觀察期當天，所有流程皆於三軍總醫院臨床試驗中心進行，餐點及杯水由研究護士協助於固定時間發放。餐點除了標準化飲食，在午餐的部分會額外加入(精)生重 200 克的試驗蔬菜，並於空腹 (T_f)、午餐前 (T_0) 及午餐後 (T_1 - T_7) 進行固定時間的血液、尿液檢體採集以及血壓測量。

第二節 試驗對象

一、受試者招募：

試驗於網路電子佈告欄及三軍總醫院張貼宣傳海報，符合條件的報名者在試驗進行前皆須參加說明會並且簽署受試者同意書 (附錄一)，之後試驗將於三軍總醫院臨床試驗中心進行，本次試驗共招募 10 位受試者。

二、受試者資格

(一) 納入條件：

1. 年齡：18-60 歲
2. 身體質量指數(body mass index, BMI)：介於 18.5-30 之間 (kg/m^2)
3. 無抽菸、酗酒等不良嗜好者

(二) 排除條件：

1. 有服用高血壓、糖尿病藥物或罹患免疫性疾病（過敏性疾病、自體免疫疾病等）、肝臟疾病、代謝性疾病（甲狀腺亢進或低下等）等不適於參加此飲食試驗者及其他重大疾病的人，如癌症。
2. 不願停掉本研究評估後認為可能影響實驗結果的膳食補充劑者
3. 無法配合食用本研究提供的膳食者
4. 試驗進行前三個月內有發生泌尿道感染或使用抗生素者

第三節 試驗飲食

一、標準化飲食(standardized diet, STD diet)

(一) 設計原則

標準化飲食的特色是不含蔬菜、水果及其製品，目的使受試者體內處於較低的植化素濃度以及降低個體間的代謝體型態差異[65]。根據受試者實驗前的體重、身高、年齡和性別進行計算每日所需熱量，並供應符合所需熱量的餐食，以維持受試者恆定的體重。標準化飲食的三大營養素佔熱量比例分別為醣類 53%、蛋白質 17%、脂質 30%。

(二) 不同卡路里菜單設計

配合受試者所需的熱量不同，本研究將餐點分成 1700 大卡至 2400 大卡共 4

個等級。以 2100 大卡菜單為標準菜單，每道餐點給予一個係數(2100 大卡餐點係數為 1)，依照比例來調整食材的供應量。

(三) 菜單試做與製備

本研究的餐點為冷凍餐的形式，由具有製備特殊餐點經驗的魔膳健康廚房協助完成。首先，研究人員將設計好的菜單與廚房人員討論並進行試做，事先確認所有的流程。每次烹調前，廚房人員需依照菜單上的指示，以電子秤秤量所有需要的食材生重，包括調味料以及烹调用油用量。烹調完成，由研究人員秤量每一道餐點的熟重，計算不同熱量餐盒的打菜量，寫在打菜表單上並依循表單進行秤重及打菜。每個餐盒上貼有不同顏色的標籤貼紙以區分不同熱量級別，並且標示受試者的名字及餐次。製備完成的餐盒將會儲存-18℃冷凍櫃，隔日放入保麗龍箱以宅配方式寄出。

(四) 標準化飲食菜單內容 (2100 大卡)

1. 早餐：脫脂高鈣鮮乳 200 mL，白饅頭 120 g
2. 午餐：豬肉炒飯 (豬前腿肉 100g、白飯 300g、貢丸 15g、魚板 20g)
3. 晚餐：雞肉鍋燒麵 (雞胸肉 120g、鍋燒麵 300g、貢丸 15g、魚板 20g)

二、 試驗蔬菜

(一) 來源

每一樣蔬菜的農場來源皆選自台灣主要產量的地區，且必須確認為同一時期採收的蔬菜，以降低變異性。菠菜和芹菜透過松青超市分別向雲林縣西螺鎮的振興果菜生產合作社以及農會蔬菜產銷班訂購；山苦瓜(花蓮一號)由花蓮縣壽豐鄉志學有機農場提供；洋蔥(黃洋蔥)與甜菜根則透過台塑有機農場分別向屏東縣恆春鎮欣洋有機農場以及高雄縣杉林鄉慶裕有機農場訂購。

(二)製備流程

請當地農場於每次試驗的前一天，冷藏宅配至三軍總醫院的營養部門，由庫房人員進行驗收並放置 4°C 冷房保存。所有蔬菜的烹調處理皆為同一位廚師進行，試驗前研究人員先與廚師確認整個流程並訂定流程表，每次製備皆需依據流程表進行，並記錄蔬菜烹調前後的秤重結果。由於烹調時間及方式會影響其植化素活性及流失比率，因此選擇以快炒或蒸煮的方式儘量保持營養素的完整性，每 100 克蔬菜加入 5g 沙拉油及 1 克鹽調味。

第四節 檢體及資料收集

此部分與研究護士討論後，所有流程皆根據試驗操作手冊(附錄二)進行。

一、個案報告表(附錄三)

由研究護士填寫，包含個人基本資料、血壓測量值和檢體收集的時間。

二、檢體採樣流程

首先，受試者於早上 7:30 空腹至臨床試驗中心報到，繳交早上起床後第一次的全部尿液，隨後進行血壓測量，並於手臂上安裝靜脈留置針抽取空腹血液，完成上述空腹時間點(T_f)測量者，即可領取早餐，並需在 9:00 前食用完畢。在吃完早餐到午餐前這段時間，我們要求受試者至少先排尿一次，其用意是避免午餐前的尿液受到早餐影響，而使之後要比較餐後變化的結果被遮蔽，此階段排放的尿液不需保留。發放午餐的時間是 11:30，先測量受試者午餐前(T_0)的血壓，並且收集血液和單點尿液，完成上述步驟者，才可食用午餐，並於 30 分鐘之內食用完畢。之後每隔一小時進行測量血壓以及血液的採樣，每隔兩小時收集一次尿液，至餐後第 7 小時(T_7)結束。

三、血壓值測量

以床邊監控儀(Hewlett Packard, M1204A)進行介入前以及介入後的每小時血壓測量，一共 9 個時間點。每次測量皆為連續測量 4 次，測量間隔 2 分鐘避免因測

量造成的干擾。之後以第 2 次及第 3 次的平均值計算，若這兩次的收縮壓或舒張壓相差大於 10mmHg，則以第 2、3、4 次測量中差異最小的兩次取平均值。

四、血液生化值

由台北病理中心檢驗分析，檢驗項目：血糖、胰島素、三酸甘油酯、總膽固醇、高密度脂蛋白膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇以及尿酸。

五、尿液生化值

由台北病理中心檢驗分析，檢驗項目：鈉、鉀、氯、鈣、鎂以及肌酐酸濃度。

第五節 尿液代謝體分析

UPLC/QTOF-MS 上機部份委託長庚大學代謝體核心實驗室進行分析。

一、檢體前處理

將儲存於-80°C 的尿液取出回溶，以 12,000 rpm，4°C，離心 30 分鐘。利用 Creatinine Assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) 測量每一管檢體的 creatinine 濃度後，將檢體依據組別及收集時間分別混合在一起，作為合併樣本 (pooling sample)，每一管 pooling sample 的 creatinine 濃度為 100µg/mL。以 syringe filter (PVDF, 0.22µm, Millipore-SLGV013NL) 過濾，取上清液進行後續分析。

二、極致效能液相層析法 (Ultra performance liquid chromatography) 分析條件

(一) 儀器系統：Waters ACQUITY UPLC™ System

(二) 管柱：BEHC18, 1.7µm, 2.1*100 mm_0162382671

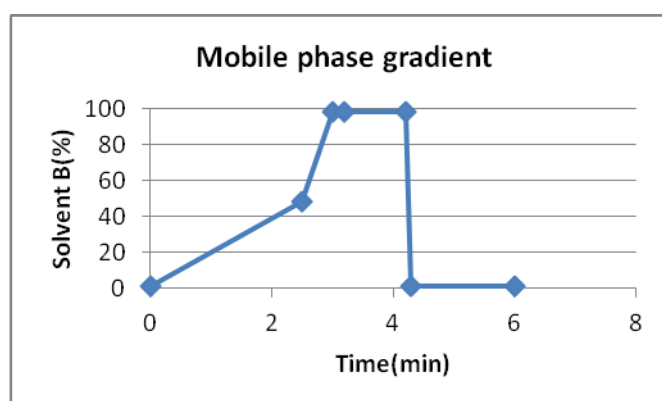
(三) 管柱溫度：45°C

(四) 移動相 A：H₂O + 2 mM ammonium formate; 移動相 B：acetonitrile (AcN)

(五) 分離梯度條件如下：總分析時間 6 分鐘。

Flow rate (ml/min)	Time (min)	Mobile phase B (%)
0.5	0	1
0.5	2.5	48
0.5	3	98
0.8	3.2	98
0.8	4.2	98
0.5	4.3	1
0.5	6	1

13



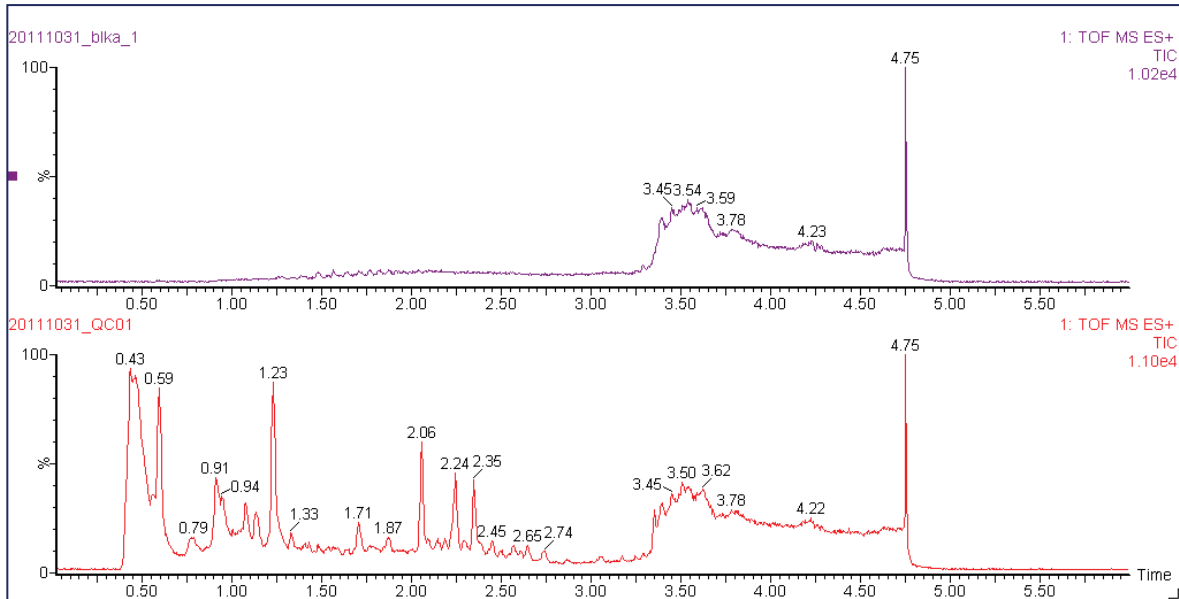


圖 2-1 UPLC 條件測試結果。

以總離子層析圖 (Total Ion Chromatogram, TIC) 呈現，橫軸為滯留時間，縱軸為訊號強度(與最大值相較的百分比)。上圖為 blank sample (H₂O)，下圖為混和所有待測檢體的 QC sample。

三、質譜儀 (Quatropde-time of flight mass spectrometer) 設定條件

- (一) 儀器系統：Waters Synapt G1 HDMS System
- (二) Ion mode: ESI+、ESI-
- (三) Scan time: 0.1(sec)
- (四) 分子篩選範圍：20-990 (m/z)
- (五) 以 sulfadimethoxine 作為 Lock Mass: 311.0814(ESI+)、309.0658(ESI-)，儀器每 10 秒偵測一次，一次讀 0.5 秒。

四、測量值評估

- (一) Repeated measurement (technical replicates)：

在同一批檢體分析時，每一管檢體會進行 6 次測量，評估測量值的信度。當總離子層析圖出現異常干擾時，則將此次測量結果排除 (圖 3-2，圖 3-3)。

- (二) Split sample measurement (biological replicates)：

每一管混合檢體分為 2 管，分成兩個批次進行測量，評估結果再現性 (圖 3-2)。

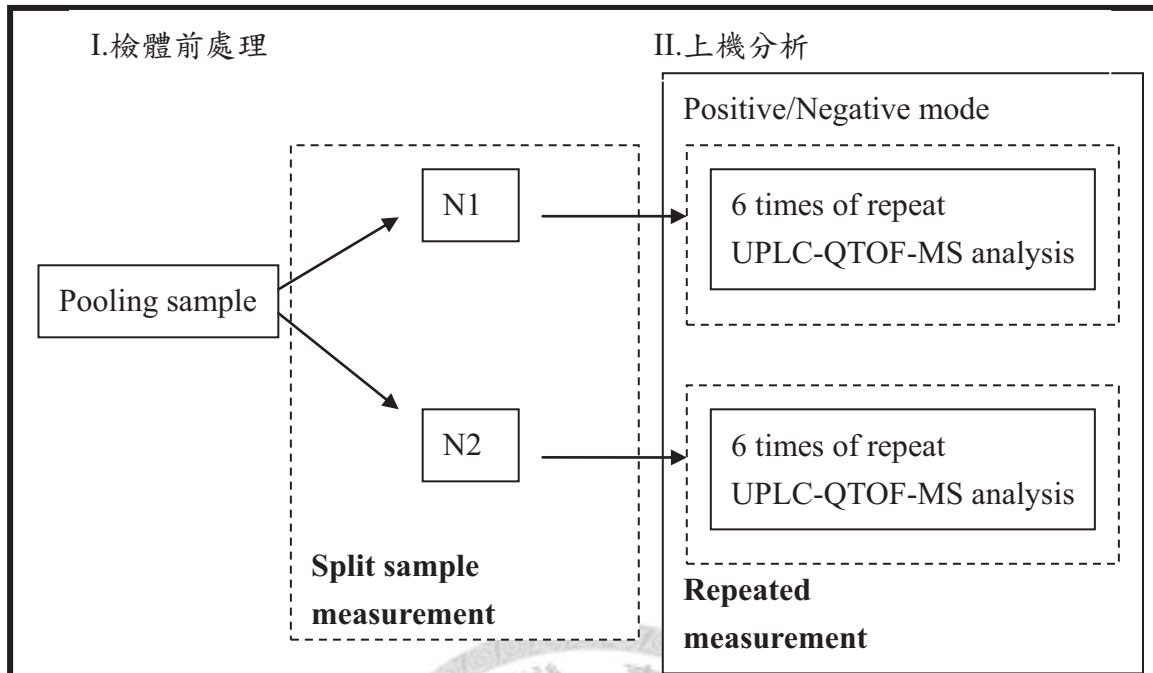


圖 2-2 檢體分析流程

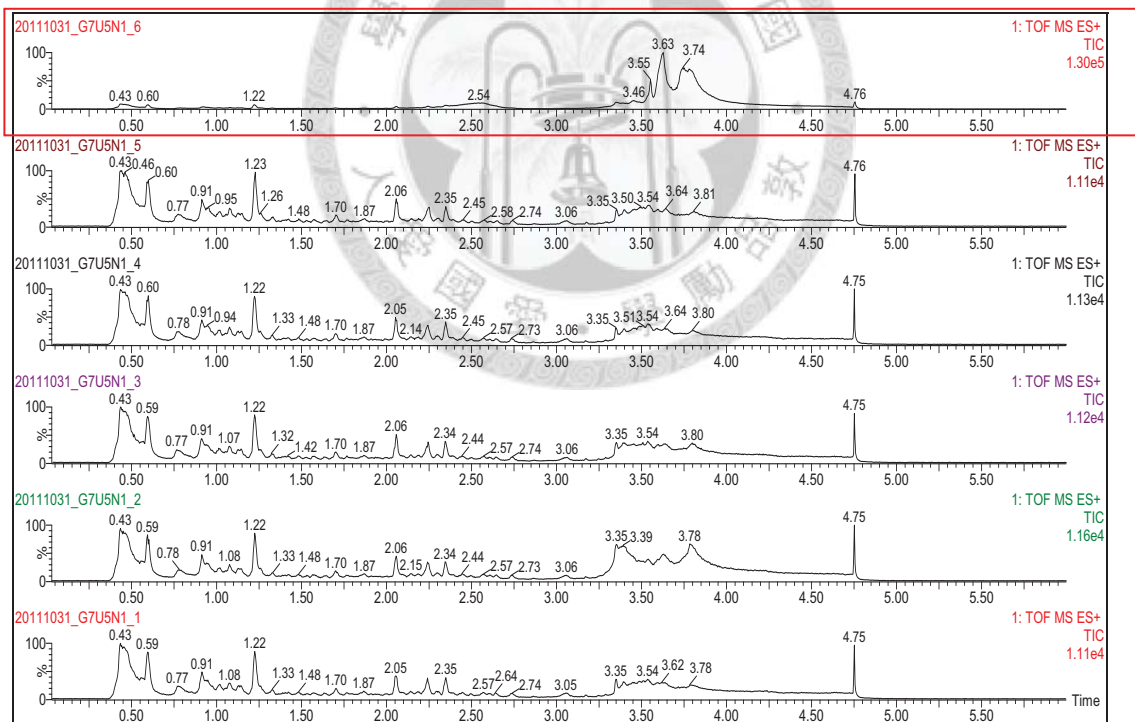


圖 2-3 以總離子層析圖評估測量值信度。

圖中由下至上為同一個檢體第 1~6 次測量，其中第 6 次測量明顯出現異常，故在之後分析予以排除。

五、質譜資料前處理(Data processing)

以 Masslynx™ 4.1 套裝軟體中的 MarkerLynx™ 進行質譜資料處理，由圖 3-1 的結果可以得知代謝物主要出現的時間範圍為 0.34~3.24 (min)，從原始的質譜資料中擷取此範圍所有資料點的荷質比(mass-to-charge ratio, m/z)、滯留時間 (retention time, RT) 以及訊號強度 (intensity) 這三個主要變數，排除總離子層析圖出現異常者後，進行質譜波峰校直 (peak alignment)。波峰校直設定條件為 Retention time window : 0.1 (s)、Mass window : 0.03 (Da)、Noise elimination level : 高於背景值 6 個標準差以及 Intensity threshold : 50 (counts) 。校直完成所得到的數據，再以 creatinine (ESI+: m/z=114.0664, RT=0.5941; ESI-: m/z=112.0500, RT=0.5923) 的訊號值進行訊號強度校正 (intensity normalization)。

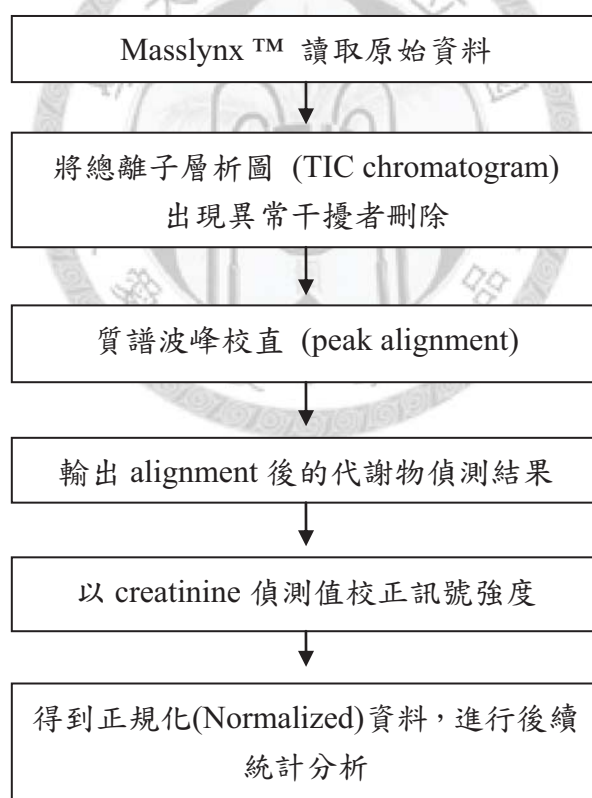


圖 2-4 質譜資料前處理流程

第六節 統計分析

一、受試者空腹狀態與午餐前基線特性資料

本研究的基線可分為兩種，一種是受試者自前一天晚餐後開始禁食至早上 8:00 的空腹狀態 (T_f)，另一種是在含有試驗蔬菜的午餐介入之前 (T_0)。在探討攝食蔬菜對人體代謝的影響之前，我們先比較受試者的各項特性(包括性別、年齡、身體質量指數、血壓、血液生化值以及尿液中礦物質排出量)在每一次試驗之間的空腹狀態及午餐前，是否有差異。尿液中礦物質排出量皆先以肌酐酸進行濃度校正。

由於本次試驗屬於小樣本的統計分析，因此以中位數 (median)及數值範圍 (range)呈現資料，並以無母數單因子變異數分析(nonparametric one-way analysis of variance)的 Kruskal-Wallis test 進行多組之間的差異性檢定，而比較任一蔬菜組與對照組之間的差異性檢定則是以 Wilcoxon rank sum test。使用統計軟體 SAS[®]9.3 的 NPAR1WAY 程序進行分析，當 $p < 0.05$ 視為具有統計上顯著差異。

二、探討蔬菜介入的效應

首先，以盒式圖 (box-plot)呈現血壓、血液生化值及尿液中礦物質排出量在各個測量時間點的變化趨勢，並找出適合的分析時間點進行分析。盒子頂端和底部的橫線分別代表 75 與 25 百分位數，盒子外最高與最低的橫線分別為最大值與最小值，盒子中的橫線則為中位數，圓點為平均值。

因為要探討攝食蔬菜的影響，故以午餐前(T_0)作為基線，將午餐後測量到的所有血壓及生化指標值扣除基線值，計算餐後變化量，再與對照組進行比較。但血糖及胰島素在午餐前及午餐後 1 小時的變化於各組之間的表現不同，故此部分則改以空腹狀態(T_f)做為基線。各項生化指標的變化結果以 Median (Range)呈現，並以 Wilcoxon rank sum test 與對照組進行試驗組差異性檢定。當 $p < 0.05$ 視為具有統計上顯著差異。

三、尿液代謝體資料分析

將已校正訊號強度的資料輸入 Partek Genomic Suit 6.6 進行後續分析。每一管檢體所測得的訊號數值先以 log2 轉換，並進行 Quantile normalization 調整其分佈以及測量的尺度(scale)，達到統計上的可比較性。

(一) 主成分分析法 (principle component analysis, PCA)

首先探討代謝體的整體變化趨勢，以主成分分析法(Principle component analysis, PCA)觀察組別以及介入時間的分群狀況。

(二) 曲線下面積 (incremental area under the curve, AUC)

為了更進一步探討所有代謝物在各組的表現狀況，我們計算淨曲線下面積 (Net incremental area under the curve, net AUC) 做為代謝物的餐後 7 小時總變化量。淨曲線下面積計算方式為：以午餐前(T0)為基線，計算基線以上的面積扣除基線以下的面積所得。

(三) 二因子變異數分析 (two-way ANOVA)

將代謝物的餐後總變化量以 two-way ANOVA 進行分析，並校正 technical replicates 的時間順序所造成的影響，找出在各組之間代謝變化最有差異的代謝物。此部分可分為兩階段，第一階段先以 two-way ANOVA 進行檢定，並估計錯誤發現率(false discovery rate, FDR)排除多重比較之顯著效應干擾，找出在這 6 組有顯著差異的代謝物。第二階段，以 Scheffe's methods 做事後比較，挑選與對照組以及其他組別相比有顯著差異的代謝物。當 $p < 0.05$ 視為具有統計上顯著差異。

Two-way ANOVA model : $\text{net AUC} = \text{group} + \text{rep} + e$

(1) group: control, spinach, wild bitter gourd, celery, beetroot and onion

(2) rep : the sequence of 6 technical replicates

(3) e: residual

第七節 代謝物鑑定

利用統計方法我們可找出在所有組別當中差異性最大的代謝物，挑選在各組當中特有並且其 split sample measurement (biological replicates)也能夠被測量到的代謝物，再以測定的 m/z 值搜索常用的代謝體相關資料庫，例如 KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>) [72], HMDB (www.hmdb.ca) [73], Knapsack (<http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK/>) [74], Metacyc (<http://metacyc.org/>)等進行代謝物鑑定， m/z 誤差容許值設為 30ppm。代謝物候選者再進一步利用文獻證據進行篩選。



第三章 結果

第一節 受試者空腹狀態與午餐前基線資料

本研究招募 10 位健康受試者共進行 6 次試驗，分別為對照組及 5 種蔬菜組。受試者平均出席率為 80%，參與人數：對照組(10 人)、菠菜組(9 人)、山苦瓜組(8 人)、甜菜根組(8 人)、芹菜組(7 人)、洋蔥組(6 人)。受試者以女性居多，佔 50~62.5%，年齡介於 19~56 歲，BMI 介於 20.9~27.1 之間，與正常範圍 18.5~24.0 相比較偏高。表 3-1~表 3-4 結果顯示血糖、胰島素濃度、血脂、血液中尿酸於空腹基線與午餐前基線的中位數值，在所有組別之間以及蔬菜組與對照組比較皆無顯著差異。尿液礦物質排出量則於空腹基線值中，芹菜組的鈉/肌酐酸比值與甜菜根組的氯/肌酐酸比值與對照組相較達到統計上顯著差異，而午餐前基線則皆無顯著差異。

第二節 攝食蔬菜對血壓及一般生化值的影響

一、血壓

圖 3-1(a)以及圖 3-1(b)顯示無論是否有蔬菜的介入，收縮壓與舒張壓在餐後皆有逐漸增加的趨勢，且於餐後第 2、5、7 小時有較大的變化波動，因此挑選這 3 個時間點，將個別蔬菜與對照組進行比較。圖 3-3 的結果顯示：菠菜及甜菜根比對照組較能顯著減少收縮壓的增加，且於餐後第 5 個小時達到顯著差異。但芹菜組與對照組相比的收縮壓則是上升，於餐後第 7 小時達到顯著差異。而洋蔥對於舒張壓的增加則是較對照組有顯著降低的功效，於餐後第 2 小時達到顯著差異。

二、血糖及胰島素濃度

圖 3-1(c)以及圖 3-1(d)顯示血糖及胰島素濃度在進食後明顯上升，且個體間變化差異增加，直至午餐後 4-5 小時逐漸回復至空腹時的狀態，且個體間差異較小。分析血糖及胰島素濃度於餐後第 2、4、7 小時，從圖 3-4 (a)發現菠菜組於餐後第 4

小時較對照組血糖變化顯著較低，而甜菜根組與洋蔥組則在餐後第 7 小時顯著較對照組高。而圖 3-4(b)則顯示胰島素濃度變化，除了洋蔥與對照組相較於餐後 2 小時顯著較低，其餘組別皆無顯著差異。

三、血液中脂質的變化

圖 3-1(e)至 3-1(h)分別顯示血液中總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白膽固醇以及低密度脂蛋白膽固醇的變化趨勢。總膽固醇整體而言看不出變化趨勢；三酸甘油酯於午餐後開始上升，並於餐後第 3 小時左右開始下降；高密度脂蛋白膽固醇的變化趨勢為先下降後上升，而低密度脂蛋白膽固醇則是先上升後下降，且兩者皆約在餐後第 3 小時達到最大變化。

圖 3-5 的結果顯示血脂於餐後第 3、5、7 小時的變化。在總膽固醇以及低密度脂蛋白膽固醇的變化量，各蔬菜組與對照組相比皆無顯著差異。而山苦瓜組和洋蔥組皆較對照組能降低三酸甘油脂的濃度，且與餐後第 5、7 小時達到顯著差異。而芹菜組及洋蔥組與對照組相較能提升高密度脂蛋白膽固醇的濃度，於餐後第 5 小時達到顯著差異。

四、血液中尿酸變化

圖 3-1(i)顯示的血液中尿酸的濃度改變為一個逐漸下降的趨勢。圖 3-6 的結果顯示：菠菜組、山苦瓜組以及芹菜組血液中尿酸下降的程度皆較對照組為低，菠菜於餐後第 2 小時達到顯著差異，山苦瓜組於餐後第 4 小時達到顯著差異，而芹菜組則於餐後第 2 小時以及第 4 小時皆達到顯著差異。

五、尿液中礦物質排出量

圖 3-2(a)至圖 3-2(e)顯示尿液中礦物質的排出量的變化趨勢。結果顯示 Na/Cr、Cl/Cr、K/Cr 為隨著時間逐漸增加，而 Mg/Cr 及 Ca/Cr 則為先增加後降低。圖 3-7 顯示菠菜組在尿液中測得的 K/Cr 於餐後 4-7 小時顯著較對照組高，Mg/Cr 以及 Ca/Cr 則分別在餐後 0-2 以及餐後 2-4 小時顯著較對照組低。芹菜組在尿液中測得的 Ca/Cr 以及 Mg/Cr 則於餐後 0-2 以及餐後 2-4 小時皆顯著較對照組高。

第三節 攝食蔬菜對尿液代謝體的影響

一、整體代謝型態

兩種 ESI 模式以及被分為兩批分析的混和檢體，以 Masslynx 進行 peak 的校直 (alignment) 後將資料輸出，在 ESI+ 模式之下得到 586 個代謝物 (split sample measure: 643 metabolites)；而 ESI- 模式測得 360 個代謝物 (split sample measurement : 393 metabolites)。圖 3-8、圖 3-9 為以主成分分析最主要的 3 個 PC score 進行 3D 圖的繪製結果，其解釋度分別於 ESI+ 模式達到 36.8% (split sample measure: 35.7%)，ESI- 模式達到 41.9% (split sample measure: 43.5%)。以時間來看，空腹時所有的代謝型態皆為較相近可形成一個群集，而午餐前與部分蔬菜組的午餐後 2 小時內為另一個群集，其餘的餐後時間點則隨著時間的推進，逐漸向空腹點靠近。整體而言，可看到尿液的代謝體隨著代謝反應出現一個 “time cycle”。若分組來看，則可清楚看到芹菜組的午餐後代謝物型態與其他組有明顯的不同。圖 3-10 則為重複測量的結果，可看到也有相同的趨勢。

二、各組蔬菜中獨特的代謝物

圖 3-11、圖 3-13 則為不同蔬菜分別於 ESI+、ESI- 模式所測得的所有代謝物與對照組相較之差異顯著表現程度，其中黑色點為該組別與其他組別以雪費事後檢定相較，皆有顯著差異之代謝物。在 ESI+ 模式下，各組所找到具有獨特性的代謝物個數分別為：菠菜組 17 個，山苦瓜組 3 個，芹菜組 63 個，甜菜根組 13 個以及洋蔥組 6 個。而在 ESI- 模式下，各組所找到具有獨特性的代謝物個數分別為：菠菜組 3 個，山苦瓜組 6 個，芹菜組 72 個，甜菜根組 10 個，洋蔥組 6 個。

圖 3-12、圖 3-14 則為不同蔬菜分別於 ESI+、ESI- 模式所測得的所有代謝物其滯留時間的分布，可看到不同蔬菜其所具有的獨特代謝物分佈狀況有所不同。圖中的箭號所指者，為已搜尋到相關文獻所記載的代謝物(10 個)。圖 3-15 顯示這 10 個代謝物，能夠依據其代表的蔬菜組別將所有的檢體分開，且在餐後 2-4 小時達到

最大的差異。

被挑選的 10 個代謝物初步鑑定結果(表 3-5)：

- 一、菠菜：兩個候選代謝物，分別可能為 melatonine 的代謝物 kynutamine $[M+NH_4]^+$ 及 terpenoids 的代謝物 $[M+H]^+$;
- 二、山苦瓜：兩個候選代謝物可能是 cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrodibenzothiophene 或 Gluconic acid/ Gulonic acid/ Mannonate/Galactonate/Altronate 的不同型態，而其中 $m/z:219.0473$ 也有可能是 coniferyl alcohol $[M+K]^+$ 。
- 三、甜菜根：挑選的候選代謝物則為 Betablamic acid，且在 positive mode 以及 negative mode 皆可被挑選到。
- 四、洋蔥：在 positive mode 挑選的候選代謝物則分別為 L-pyroglutamic acid 或 (R)-(+)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid 以及 2-aminoacrylate; Negative mode 則為 alliin/isoalliin。
- 五、芹菜：挑選的候選代謝物則為 carvone 以及 geranic acid。

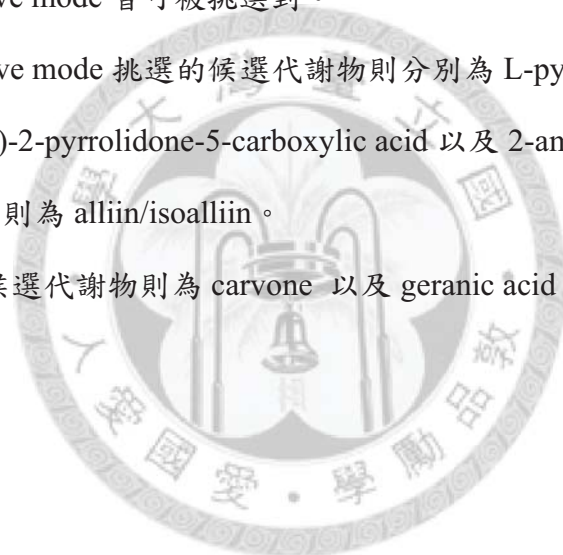


表 3-1 受試者空腹基線資料

Characteristic	Control (n=10)	Spinach (n=9)	Wild bitter gourd (n=8)	Celery (n=7)	Beetroot (n=8)	Onion (n=6)
Age (y)	26 (19~56)	26 (19~56)	28 (19~56)	30 (19~56)	28 (19~56)	26 (21~31)
Female (%)	60	55.6	62.5	57.1	50	66.7
BMI (kg/m ²)	25.4 (20.9~27.1)	25.5 (20.9~27.1)	25.4 (24.1~27.1)	25.3 (24.1~27.1)	25.2 (20.9~27.1)	25.2 (20.9~27.1)
SBP (mmHg)	101.3 (91.0~114.0)	103.5 (96.5~117.0)	103.0 (97.5~114.0)	105.0 (91.0~113.0)	96.8 (94.5~109.0)	101.3 (98.5~108.0)
DBP (mmHg)	56.5 (51.0~73.5)	62.0 (52.5~74.5)	58.8 (50.5~69.5)	61.5 (51.0~69.0)	57.3 (51.0~64.5)	56.3 (50.0~65.5)
Glucose (mg/dL)	86.0 (80.0~105.0)	87.0 (80.0~108.0)	88.5 (82.0~103.0)	84.0 (79.0~97.0)	87.5 (75.0~101.0)	83.5 (74.0~92.0)
Insulin (μU/mL)	5.20 (2.70~11.50)	5.90 (2.10~17.50)	5.30 (0.80~12.90)	6.70 (1.90~17.70)	6.50 (4.00~10.90)	4.40 (1.80~14.90)
T-Cholesterol (mg/dL)	180.5 (135.0~226.0)	177.0 (120.0~203.0)	185.0 (133.0~216.0)	174.0 (123.0~207.0)	182.0 (108.0~219.0)	173.5 (140.0~202.0)
TG (mg/dL)	88.0 (62.0~172.0)	91.0 (49.0~202.0)	90.0 (43.0~236.0)	81.0 (64.0~160.0)	80.5 (56.0~157.0)	81.0 (59.0~190.0)
HDL-C (mg/dL)	53.0 (34.0~64.0)	48.0 (36.0~73.0)	50.0 (38.0~66.0)	56.0 (34.0~59.0)	55.5 (35.0~65.0)	58.0 (41.0~61.0)
LDL-C (mg/dL)	101.5 (61.0~142.0)	103.0 (64.0~136.0)	104.5 (75.0~132.0)	103.0 (70.0~131.0)	103.5 (62.0~141.0)	91.5 (62.0~124.0)
Uric Acid (mg/dL)	4.80 (3.30~7.90)	5.80 (3.40~7.80)	5.30 (3.80~7.40)	5.00 (3.00~8.00)	5.40 (3.00~7.60)	5.30 (3.40~7.10)

1. All values are medians except female percentage; ranges in parentheses
2. No significant differences across different experiment groups were found, $P > 0.05$ (Kruskal-Wallis test)
3. No significant differences from control group were found, $P > 0.05$ (Wilcoxon rank sum test)

表 3-2 受試者午餐前基線資料

Characteristic	Control (n=10)	Spinach (n=9)	Wild bitter gourd (n=8)	Celery (n=7)	Beetroot (n=8)	Onion (n=6)
Age (y)	26 (19~56)	26 (19~56)	28 (19~56)	30 (19~56)	28 (19~56)	26 (21~31)
Female (%)	60	55.6	62.5	57.1	50	66.7
BMI (kg/m ²)	25.4 (20.9~27.1)	25.5 (20.9~27.1)	25.4 (24.1~27.1)	25.3 (24.1~27.1)	25.2 (20.9~27.1)	25.2 (20.9~27.1)
Systolic BP (mmHg)	97.5 (91.5~119.5)	109.0 (95.0~117.0)	102.5 (93.5~114.0)	95.5 (88.5~106.5)	100.8 (92.5~106.5)	102.8 (97.5~107.5)
Diastolic BP (mmHg)	54.8 (40.0~70.5)	52.5 (49.5~70.5)	54.8 (50.5~64.5)	56.0 (44.0~63.0)	49.0 (46.0~60.5)	58.0 (54.5~66.5)
Glucose (mg/dL)	110.0 (75.0~142.0)	112.0 (75.0~154.0)	99.5 (69.0~121.0)	111.0 (92.0~140.0)	113.5 (97.0~156.0)	108.5 (98~130)
Insulin (μU/mL)	46.50 (9.80~107.50)	60.60 (8.20~104.10)	28.30 (5.90~71.60)	56.80 (16.70~165.50)	47.30 (4.00~129.70)	31.20 (11.00~73.00)
T-Cholesterol (mg/dL)	167.0 (131.0~219.0)	167.0 (125.0~210.0)	192.5 (134.0~256.0)	174.0 (116.0~222.0)	180.0 (107.0~226.0)	183.0 (127.0~206.0)
TG (mg/dL)	89.0 (48.0~167.0)	80.0 (39.0~226.0)	105.0 (44.0~247.0)	124.0 (58.0~153.0)	88.0 (39.0~217.0)	94.5 (62.0~224.0)
HDL-C (mg/dL)	51.5 (35.0~61.0)	49.0 (33.0~68.0)	49.5 (30.0~63.0)	54.0 (32.0~57.0)	52.0 (34.0~62.0)	55.0 (36.0~57.0)
LDL-C (mg/dL)	101.0 (61.0~140.0)	101.0 (61.0~137.0)	99.0 (73.0~133.0)	102.0 (69.0~130.0)	102.0 (59.0~143.0)	90.0 (57.0~124.0)
Uric Acid (mg/dL)	4.70 (3.00~7.40)	5.30 (3.00~7.30)	5.00 (3.40~6.80)	4.90 (2.80~7.70)	5.20 (2.90~7.50)	4.90 (3.00~6.60)

1. All values are medians except female percentage; ranges in parentheses
2. No significant differences across different experiment groups were found, $P > 0.05$ (Kruskal-Wallis test)
3. No significant differences from control group were found, $P > 0.05$ (Wilcoxon rank sum test)

表 3-3 受試者尿液中礦物質排出量 (空腹基線值)

Urinary electrolyte excretion	Control (n=10)	Spinach (n=9)	Wild bitter gourd (n=8)	Celery (n=7)	Beetroot (n=8)	Onion (n=6)
Na/Cr (mmol/mg)	0.056 (0.047~0.071)	0.066 (0.030~0.120)	0.068 (0.017~0.102)	0.080* (0.040~0.084)	0.070 (0.048~0.127)	0.048 (0.043~0.069)
Cl/Cr (mmol/mg)	0.047 (0.034~0.072)	0.053 (0.032~0.110)	0.055 (0.027~0.083)	0.063 (0.035~0.076)	0.075* (0.043~0.120)	0.043 (0.030~0.079)
K/Cr (mmol/mg)	0.016 (0.011~0.036)	0.019 (0.010~0.029)	0.018 (0.007~0.042)	0.027 (0.008~0.036)	0.018 (0.012~0.034)	0.018 (0.009~0.028)
Mg/Cr (mg/mg)	0.051 (0.029~0.115)	0.047 (0.033~0.099)	0.044 (0.025~0.070)	0.053 (0.025~0.067)	0.039 (0.025~0.117)	0.047 (0.033~0.091)
Ca/Cr (mg/mg)	0.070 (0.022~0.140)	0.090 (0.029~0.228)	0.080 (0.013~0.105)	0.062 (0.025~0.137)	0.054 (0.028~0.180)	0.070 (0.054~0.094)

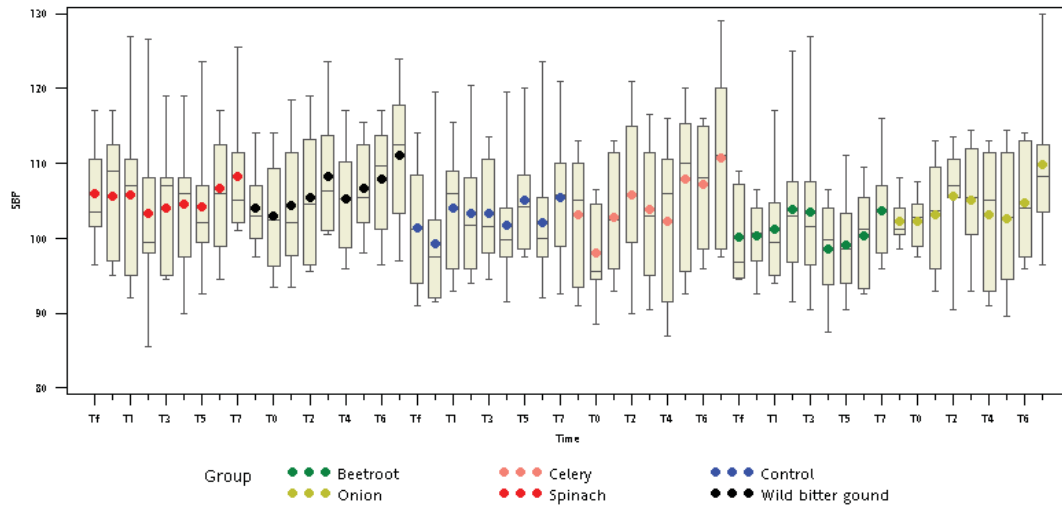
1. All values are medians and adjusted by creatinine; ranges in parentheses
2. No significant differences across different experiment groups were found, $P > 0.05$ (Kruskal-Wallis test)
3. Significant differences from control group, * $P < 0.05$ (Wilcoxon rank sum test)

表 3-4 受試者尿液中礦物質排出量 (午餐前基線值)

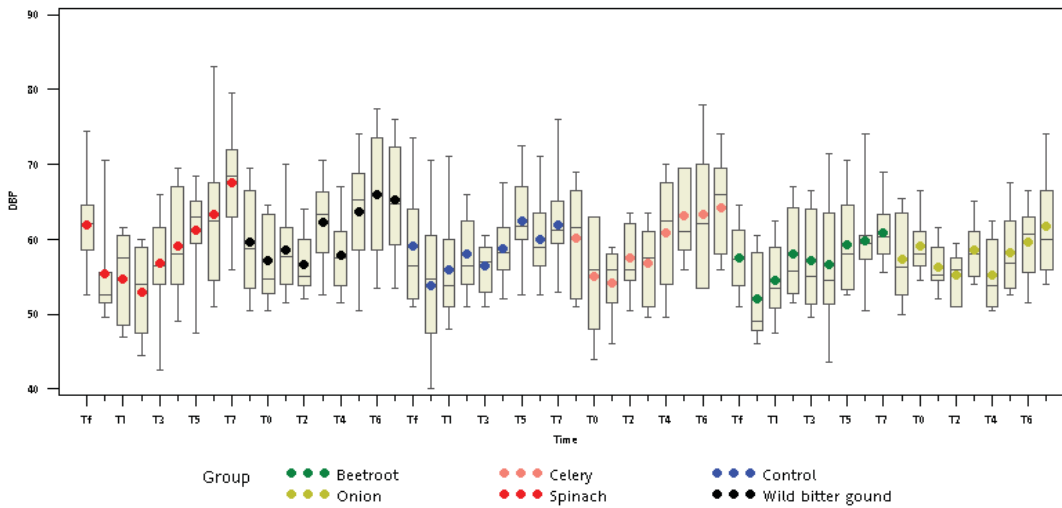
Urinary electrolyte excretion	Control (n=10)	Spinach (n=9)	Wild bitter gourd (n=8)	Celery (n=7)	Beetroot (n=8)	Onion (n=6)
Na/Cr (mmol/mg)	0.090 (0.051~0.197)	0.122 (0.043~0.180)	0.091 (0.051~0.210)	0.091 (0.063~0.115)	0.073 (0.055~0.122)	0.063 (0.046~0.098)
K/Cr (mmol/mg)	0.021 (0.008~0.038)	0.014 (0.010~0.032)	0.023 (0.012~0.058)	0.025 (0.007~0.033)	0.016 (0.005~0.031)	0.012 (0.011~0.028)
Cl/Cr (mmol/mg)	0.094 (0.065~0.201)	0.105 (0.058~0.202)	0.107 (0.065~0.196)	0.102 (0.067~0.117)	0.086 (0.063~0.125)	0.072 (0.051~0.112)
Ca/Cr (mg/mg)	0.300 (0.093~0.506)	0.356 (0.103~0.456)	0.265 (0.185~0.397)	0.230 (0.102~0.371)	0.193 (0.117~0.312)	0.275 (0.153~0.431)
Mg/Cr (mg/mg)	0.118 (0.082~0.261)	0.116 (0.092~0.153)	0.109 (0.075~0.171)	0.100 (0.072~0.193)	0.100 (0.066~0.164)	0.107 (0.084~0.200)

1. All values are medians and adjusted by creatinine; ranges in parentheses
2. No significant differences across different experiment groups were found, $P > 0.05$ (Kruskal-Wallis test)
3. No significant differences from control group, $P > 0.05$ (Wilcoxon rank sum test)

(a) 收縮壓



(b) 舒張壓



(c) 血糖

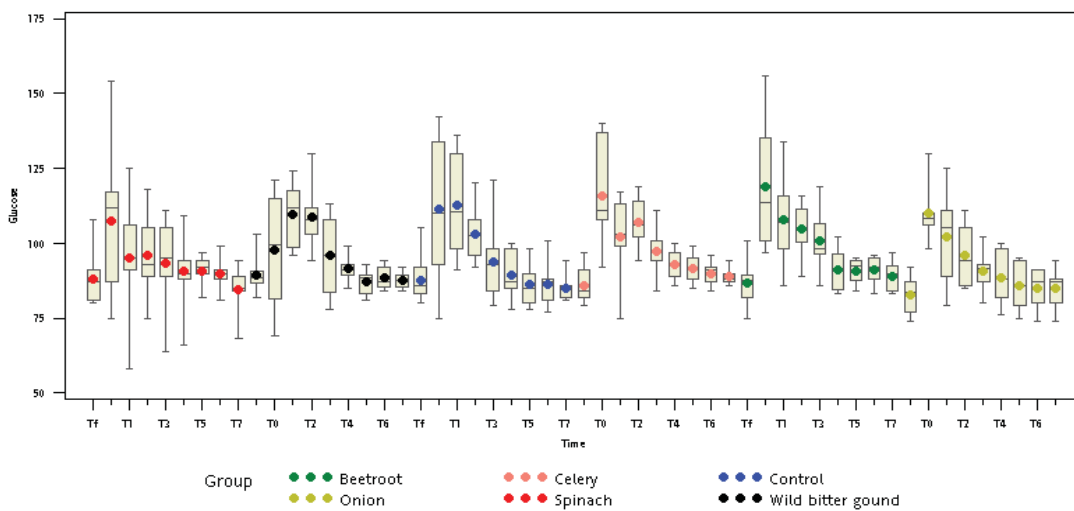
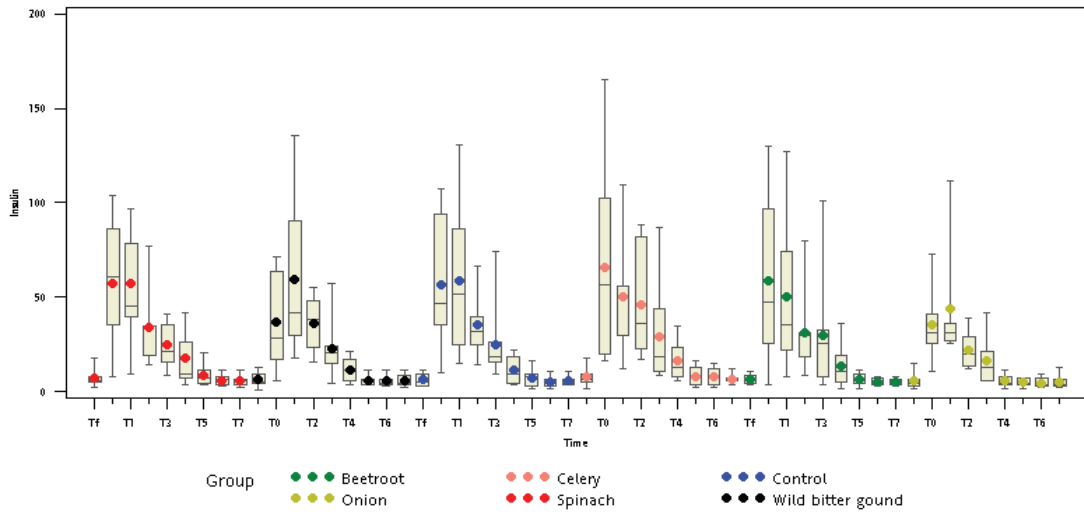


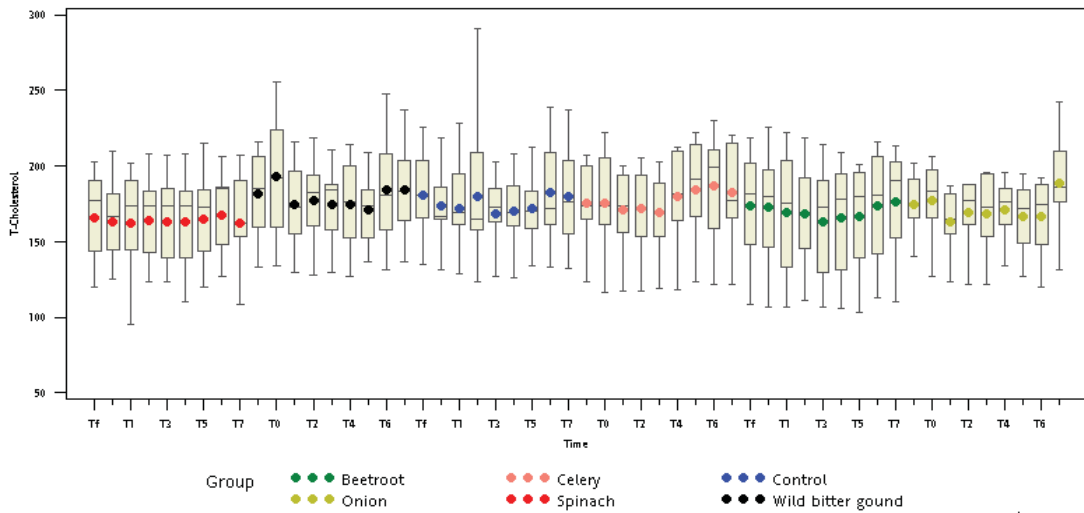
圖 3-1 以盒式圖呈現血壓及血液生化值變化趨勢

(Tf:空腹 T₀:午餐前 T₁-T₇:餐後 1-7 小時)

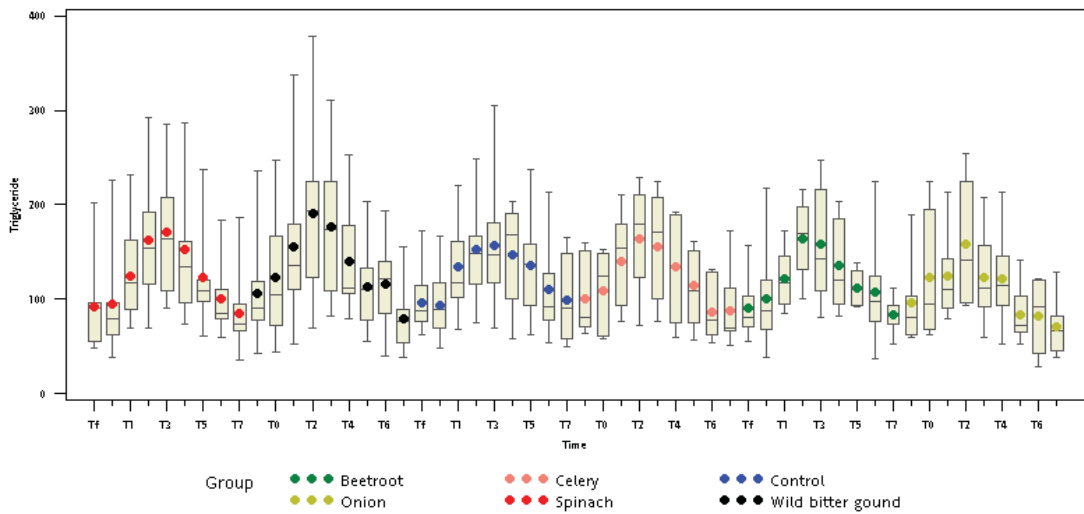
(d) 胰島素



(e) 總膽固醇

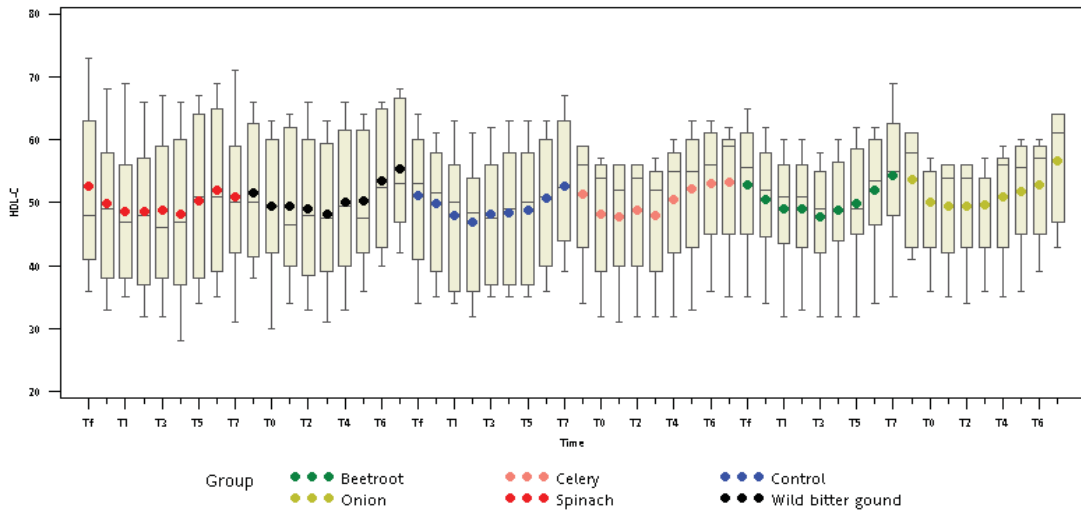


(f) 三酸甘油酯

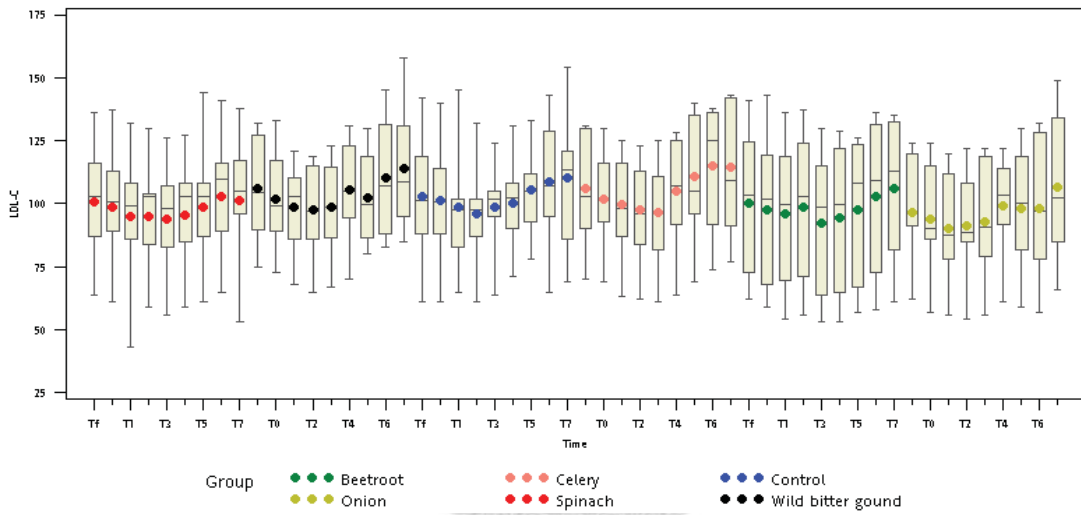


(續圖 3-1) 以盒式圖呈現血壓及血液生化值變化趨勢

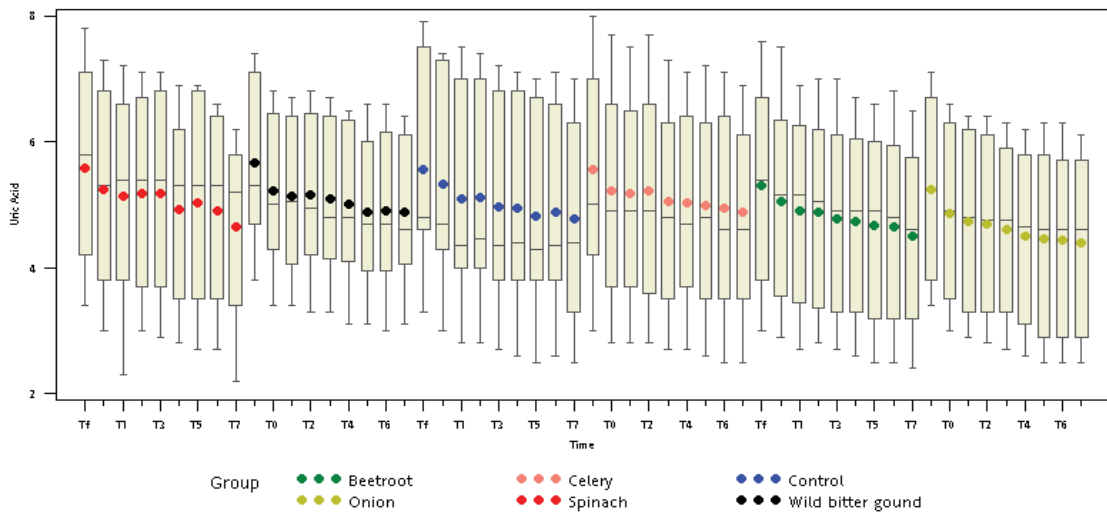
(g) 高密度脂蛋白膽固醇



(h) 低密度脂蛋白膽固醇

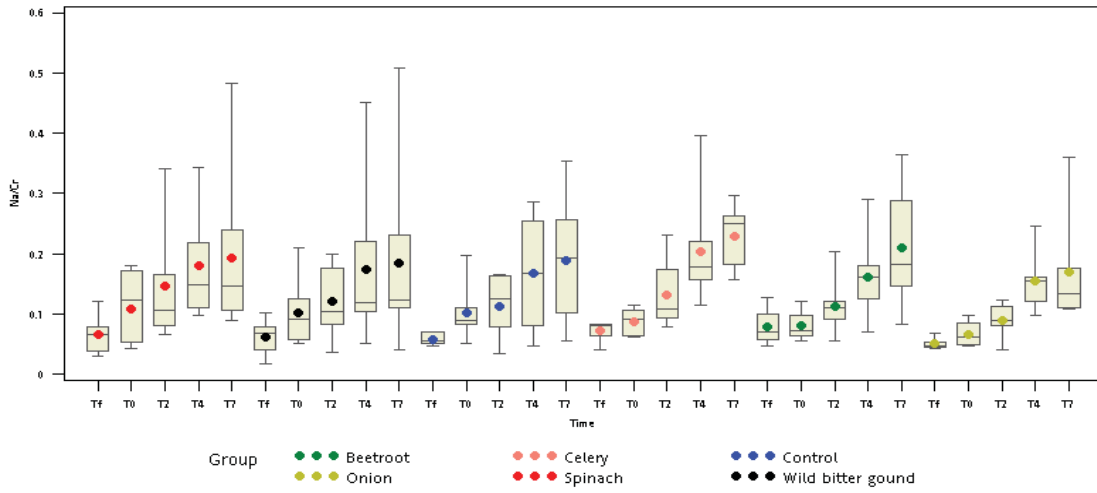


(i) 尿酸

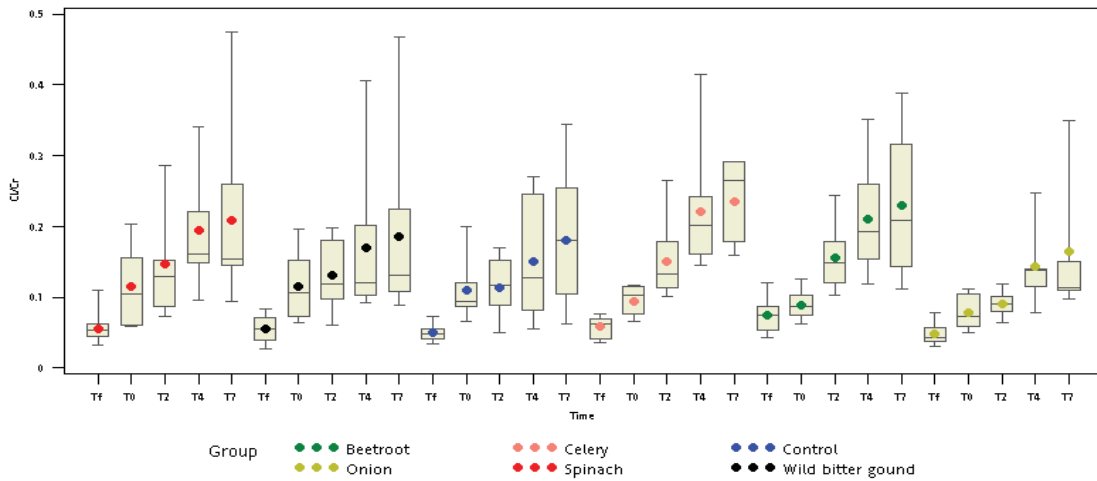


(續圖 3-1) 以盒式圖呈現血壓及血液生化值變化趨勢

(a) 鈉/肌酐酸



(b) 氯/肌酐酸



(c) 鉀/肌酐酸

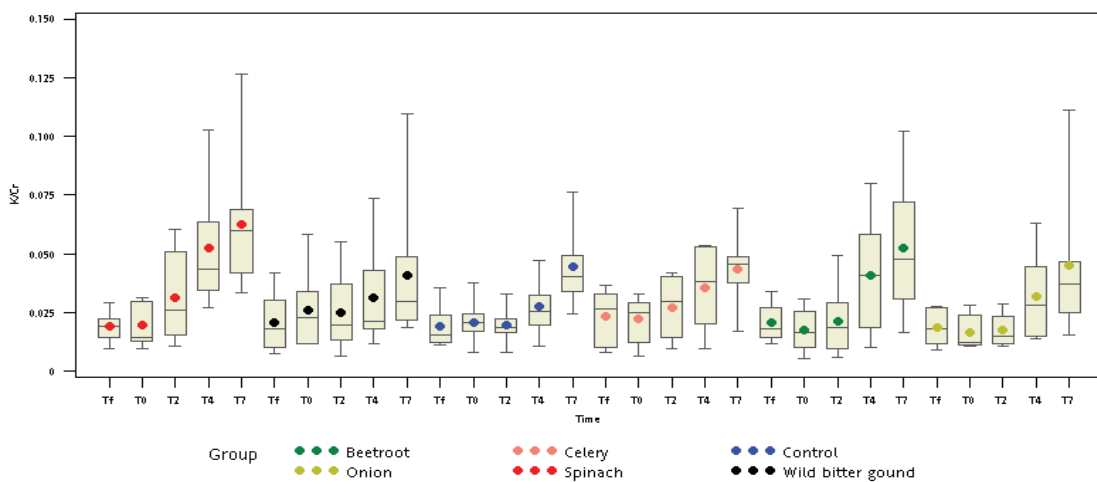
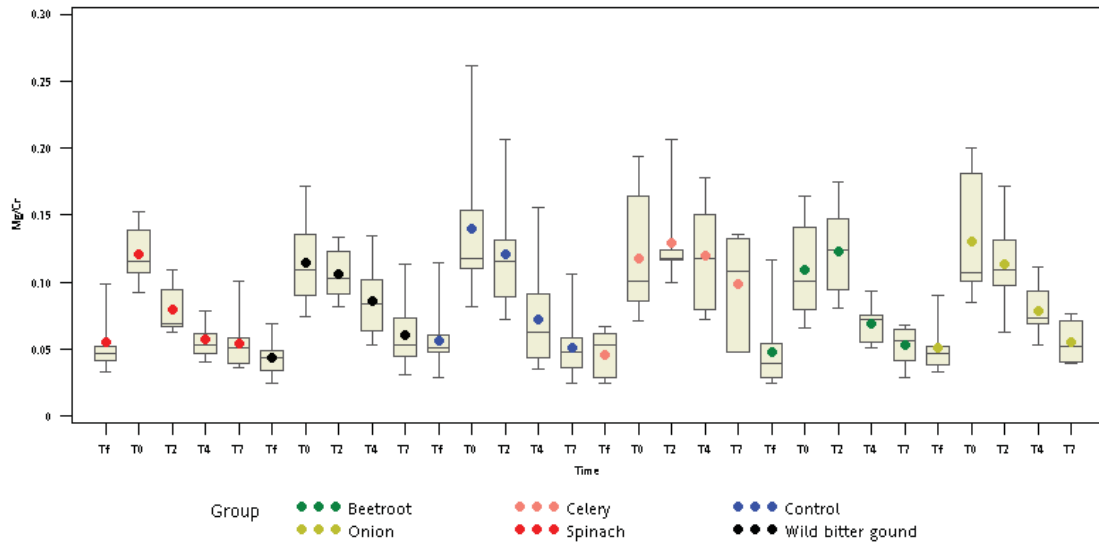


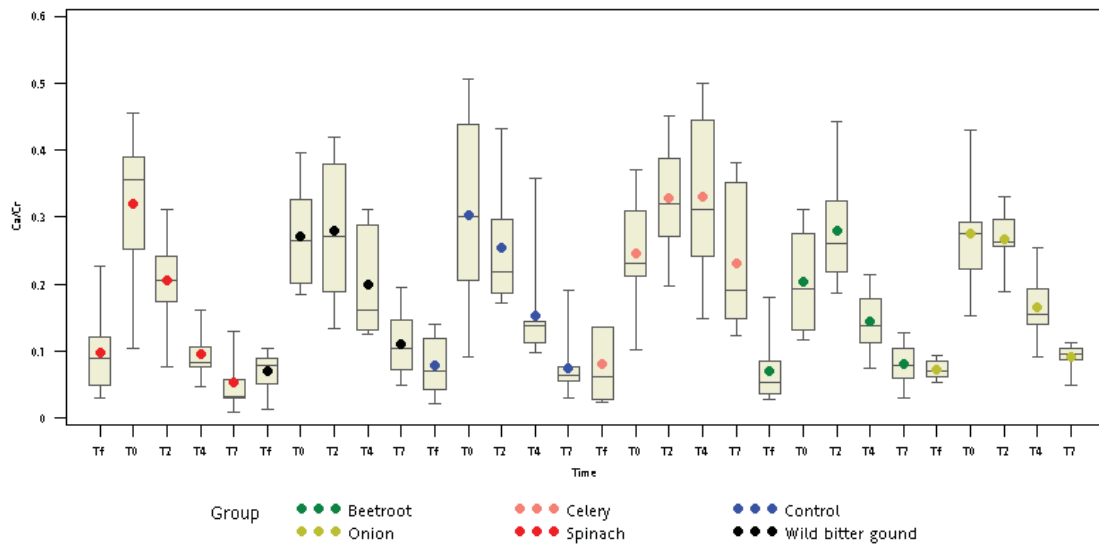
圖 3-2 以盒式圖呈現尿液中礦物質變化趨勢

(T_f:空腹 T₀:午餐前 T₂:餐後 0-2 小時 T₄:餐後 2-4 小 T₇:餐後 4-7 小時)

(d) 鈣/肌酐酸

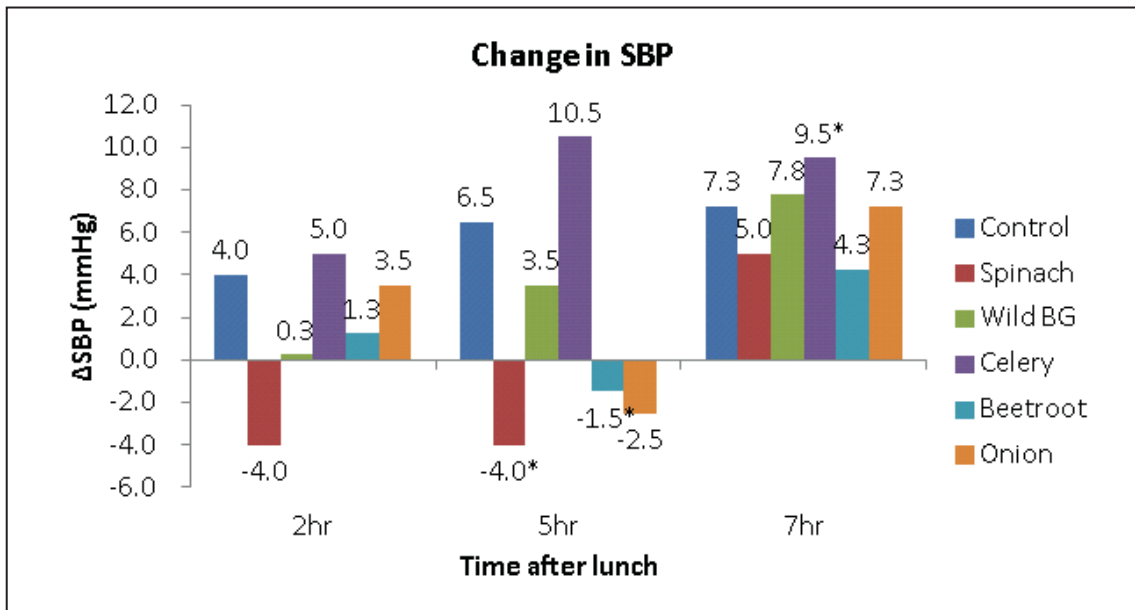


(e) 鎂/肌酐酸



(續圖 3-2) 以盒式圖呈現尿液中礦物質變化趨勢

(a) 收縮壓



(b) 舒張壓

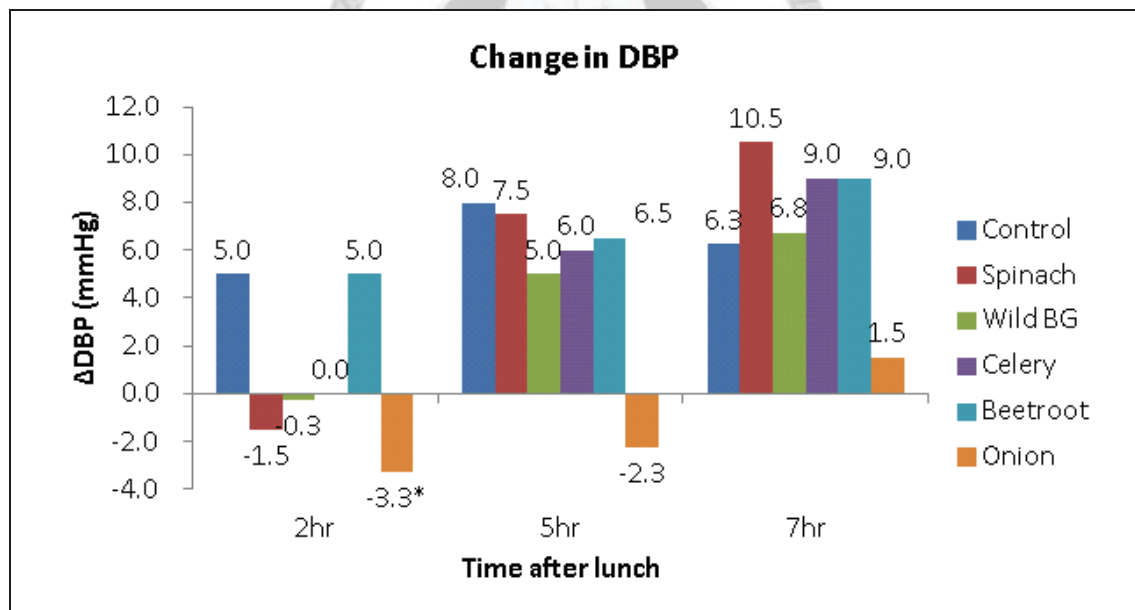
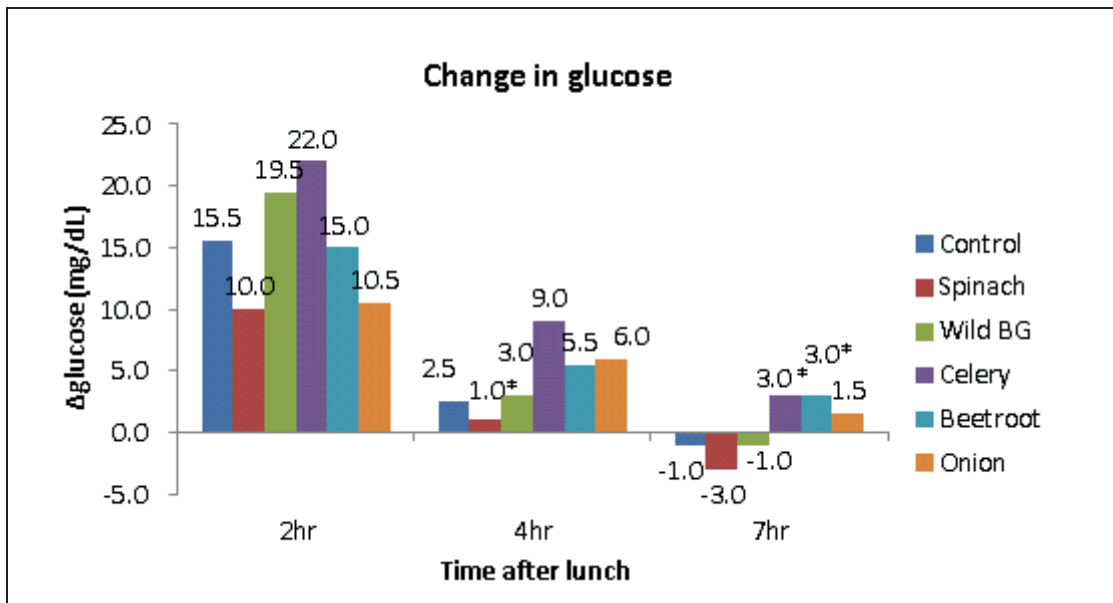


圖 3-3 血壓於餐後 2、5、7 小時的變化值

(所有數值扣除午餐前基線，以 Wilcoxon rank sum test 與對照組進行差異性檢定，

* $p < 0.05$)

(a) 血糖



(b) 胰島素

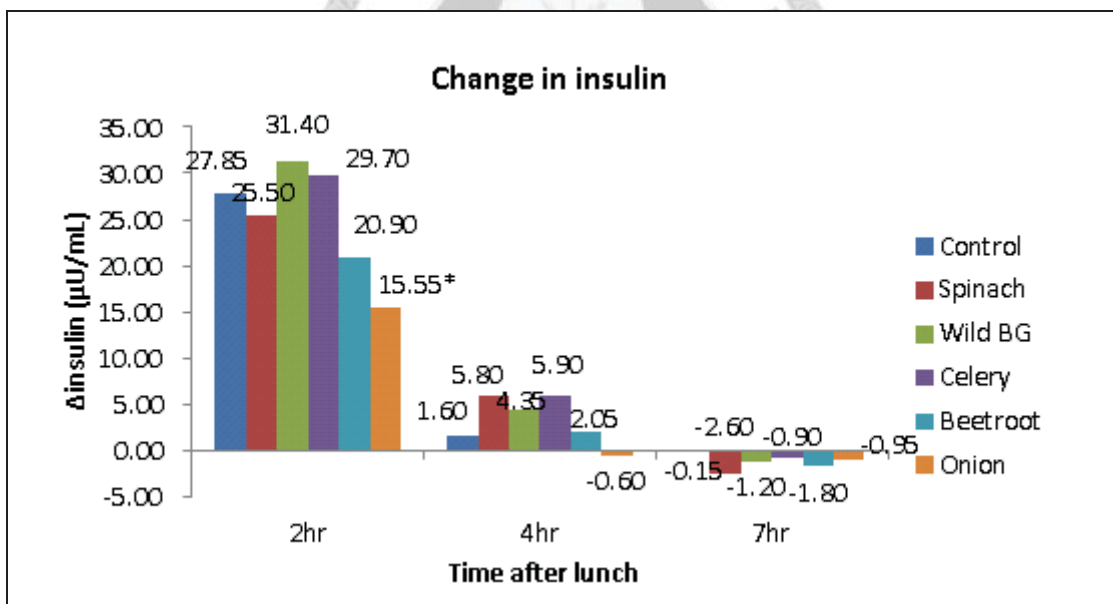
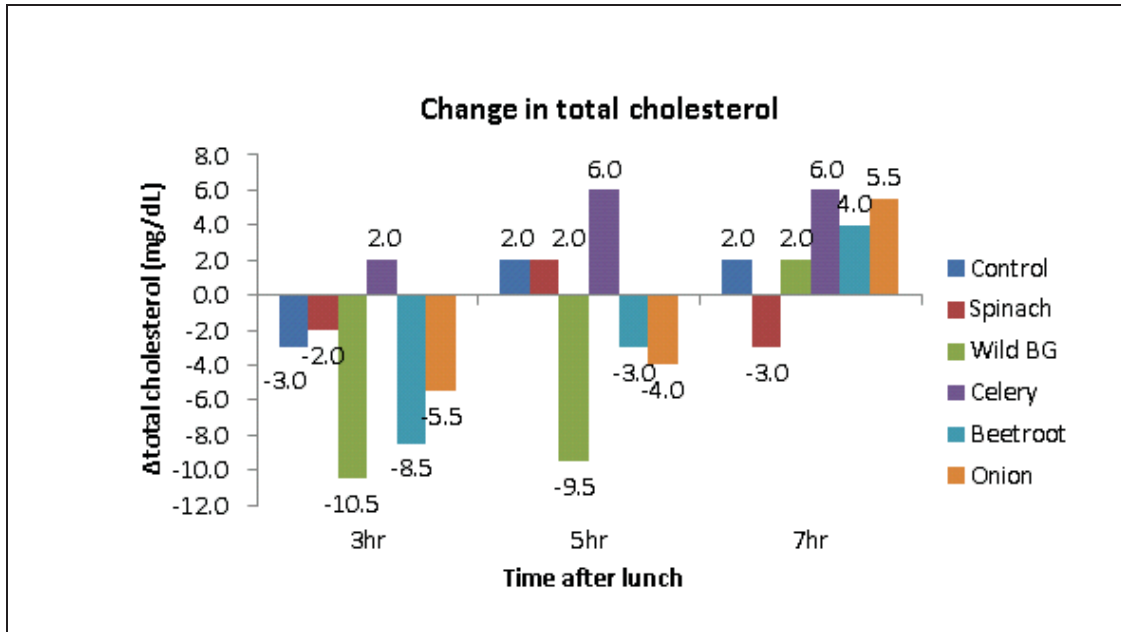


圖 3-4 血糖及胰島素於餐後 2、4、7 小時的變化值

(所有數值扣除空腹基線，以 Wilcoxon rank sum test 與對照組進行差異性檢定，* $p < 0.05$)

(a) 總膽固醇



(b) 三酸甘油酯

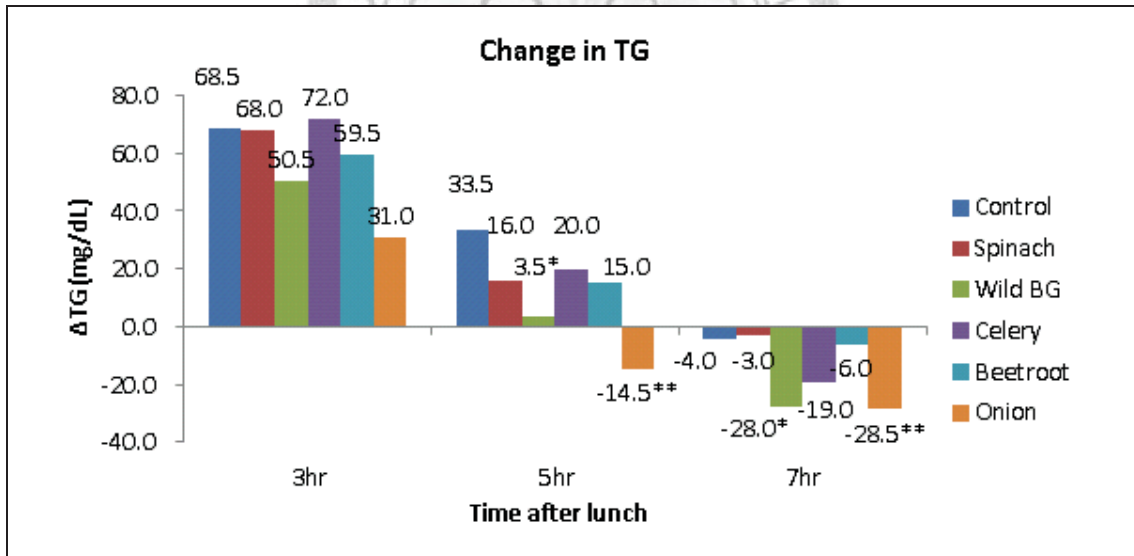
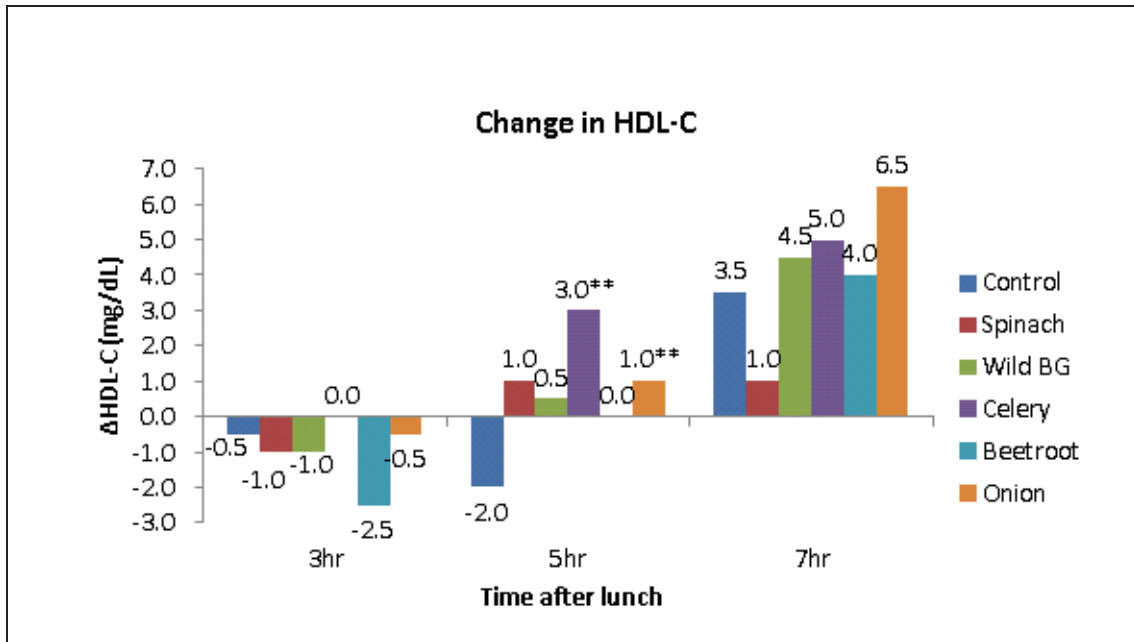


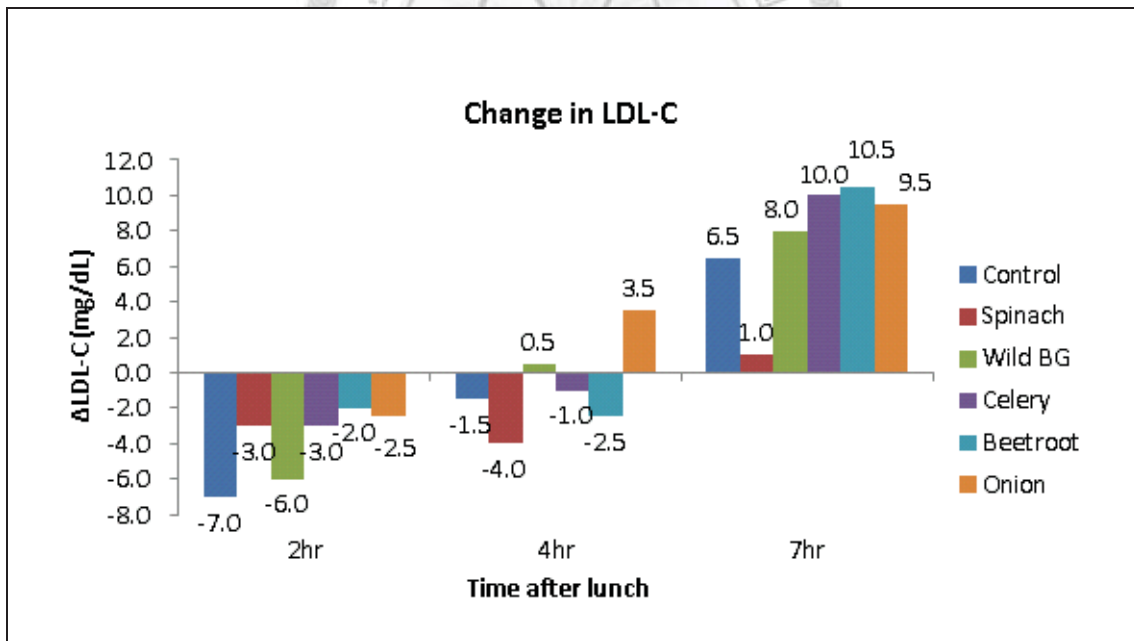
圖 3-5 血脂於餐後 3、5、7 小時的變化值

(所有數值扣除午餐前基線，以 Wilcoxon rank sum test 與對照組進行差異性檢定，* $p < 0.05$ ** $P < 0.01$)

(c) 高密度脂蛋白膽固醇



(d) 低密度脂蛋白膽固醇



(續圖 3-5) 血脂於餐後 3、5、7 小時的變化值

(所有數值扣除午餐前基線，以 Wilcoxon rank sum test 與對照組進行差異性檢定，

* $p < 0.05$ ** $P < 0.01$)

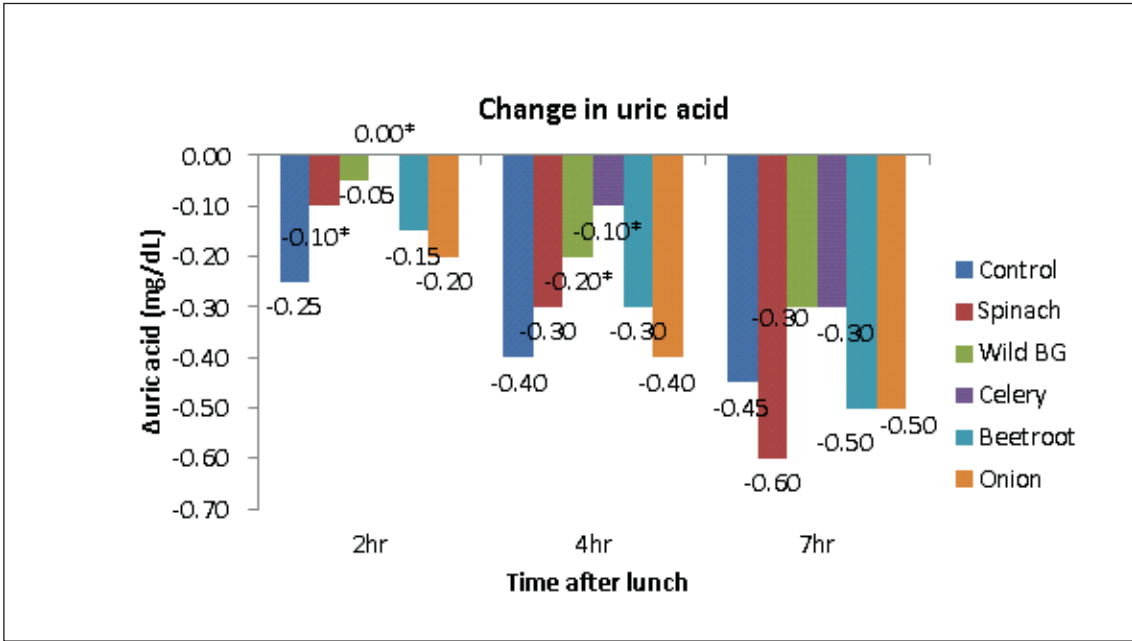
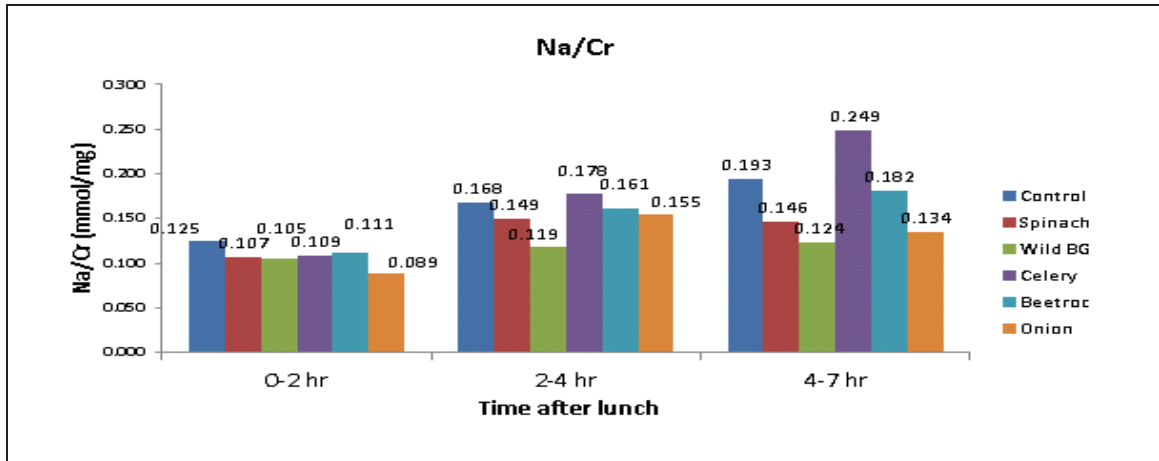


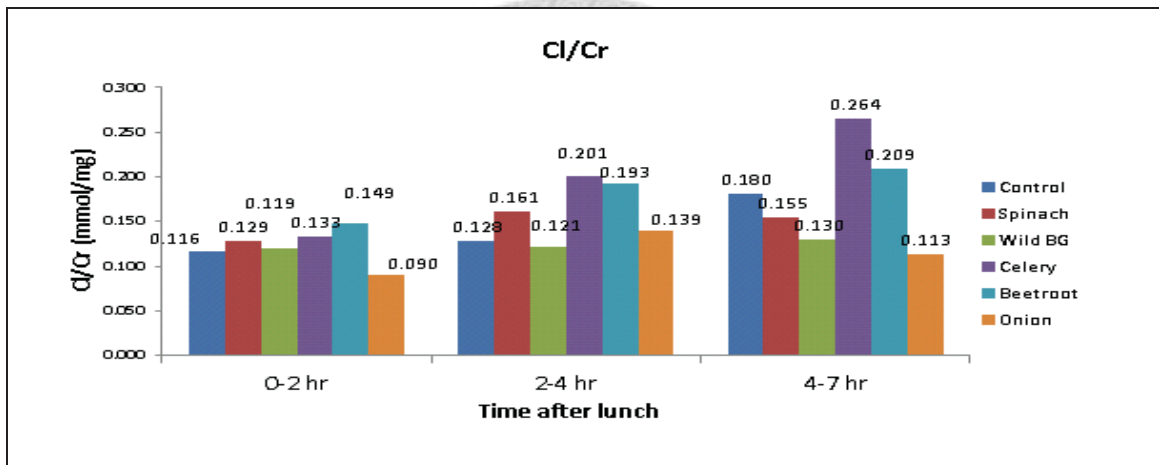
圖 3-6 血液中尿酸於餐後 2、4、7 小時的變化值
 (所有數值扣除午餐前基線，以 Wilcoxon rank sum test 與對照組進行差異性檢定，
 * $p < 0.05$)



(a) 鈉/肌酐酸



(b) 氯/肌酐酸



(c) 鉀/肌酐酸

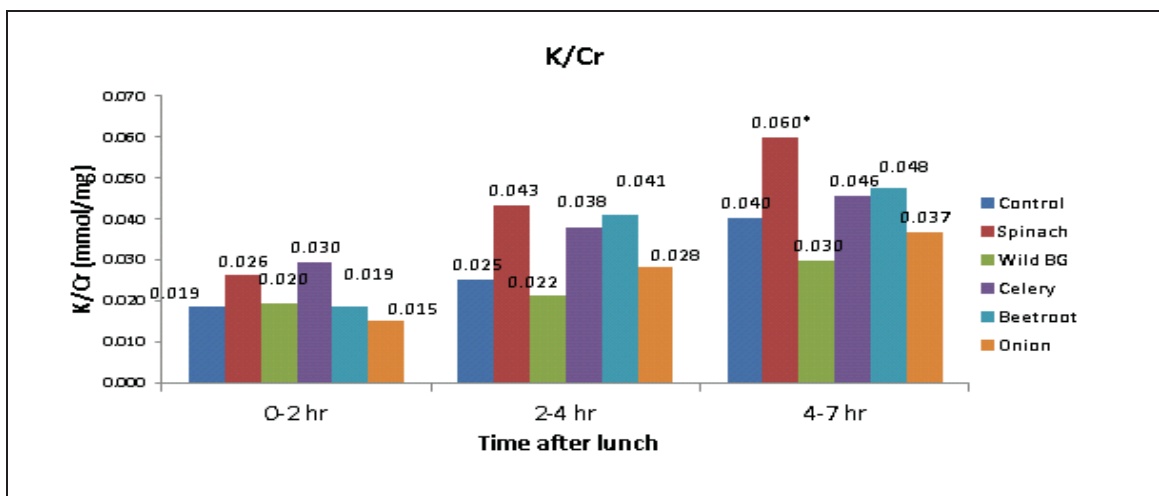
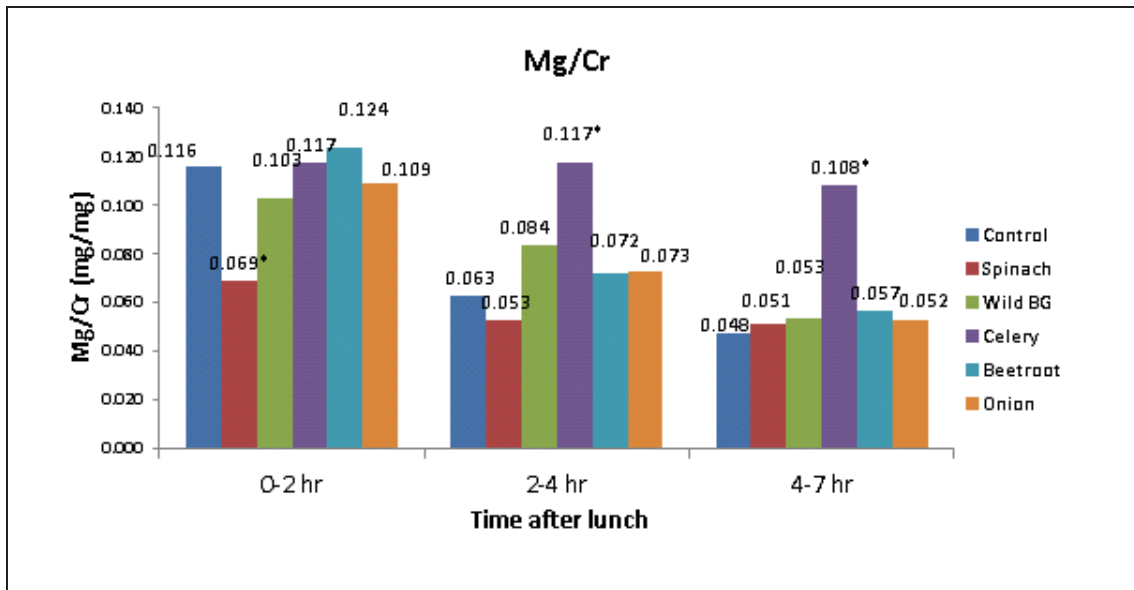
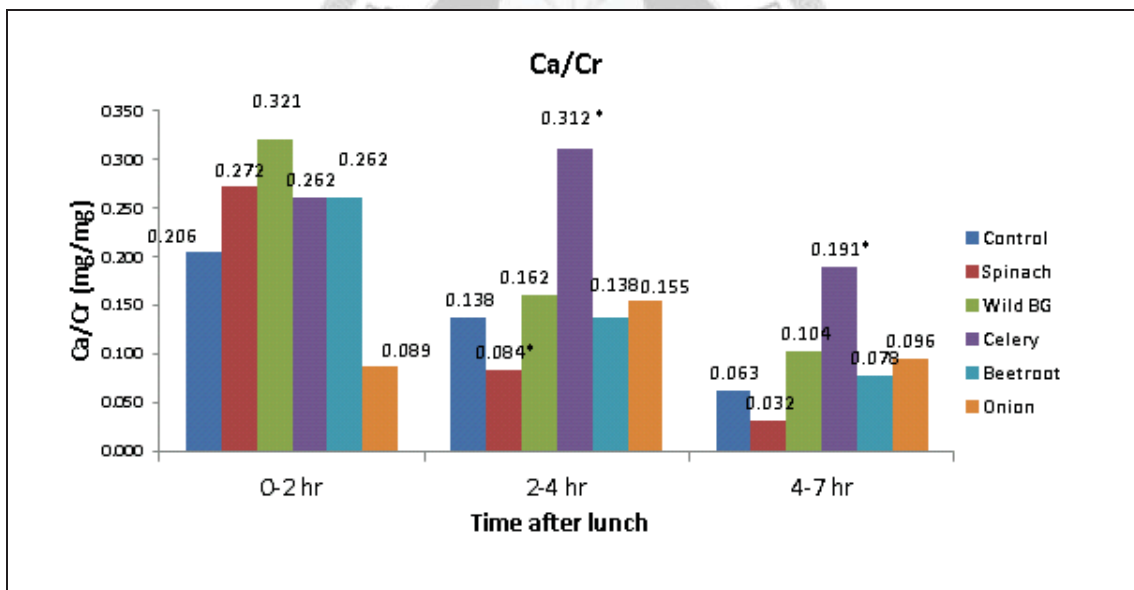


圖 3-7 尿液中礦物質排出量餐後變化趨勢

(d) 鎂/肌酐酸

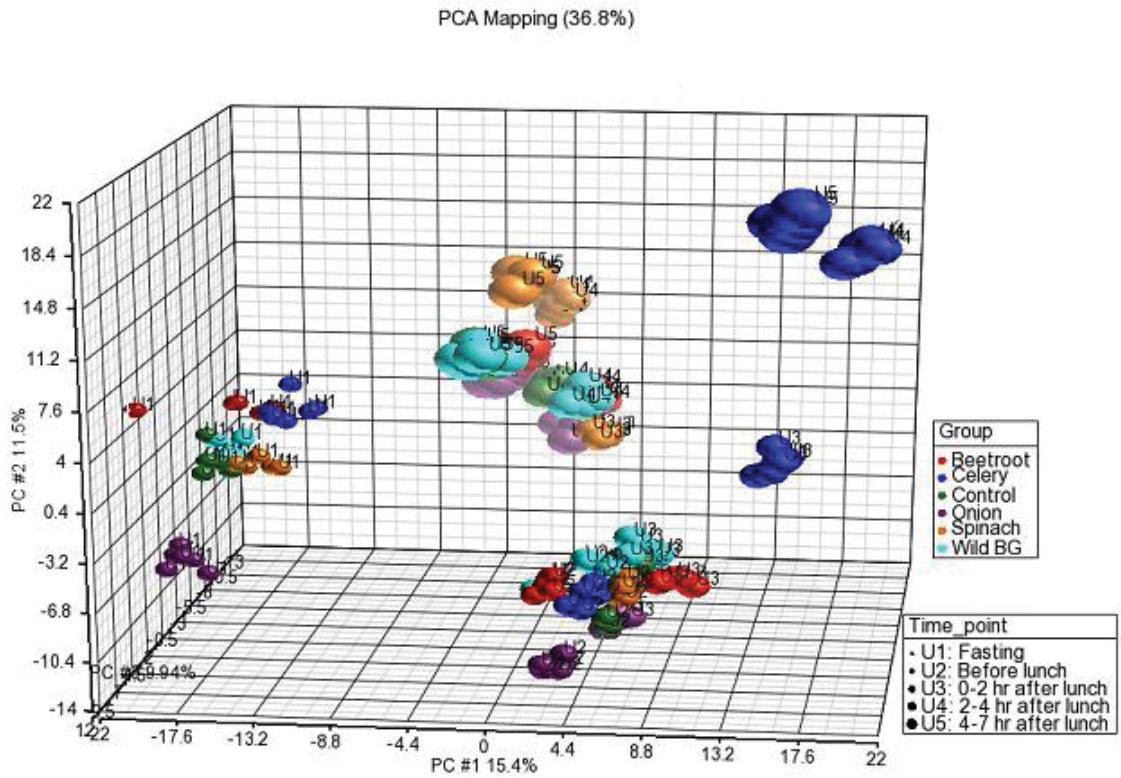


(e) 鈣/肌酐酸



(續圖 3-7) 尿液中礦物質排出量餐後變化趨勢

(a) 所有組別



(b) 菠菜組 vs. 對照組

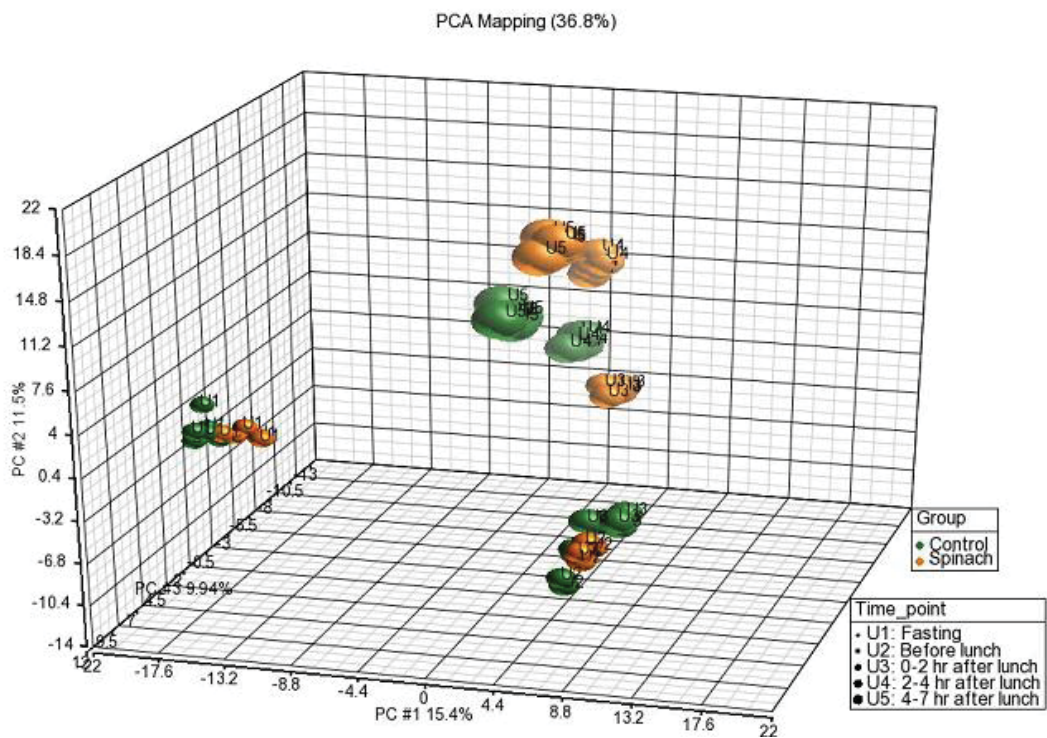
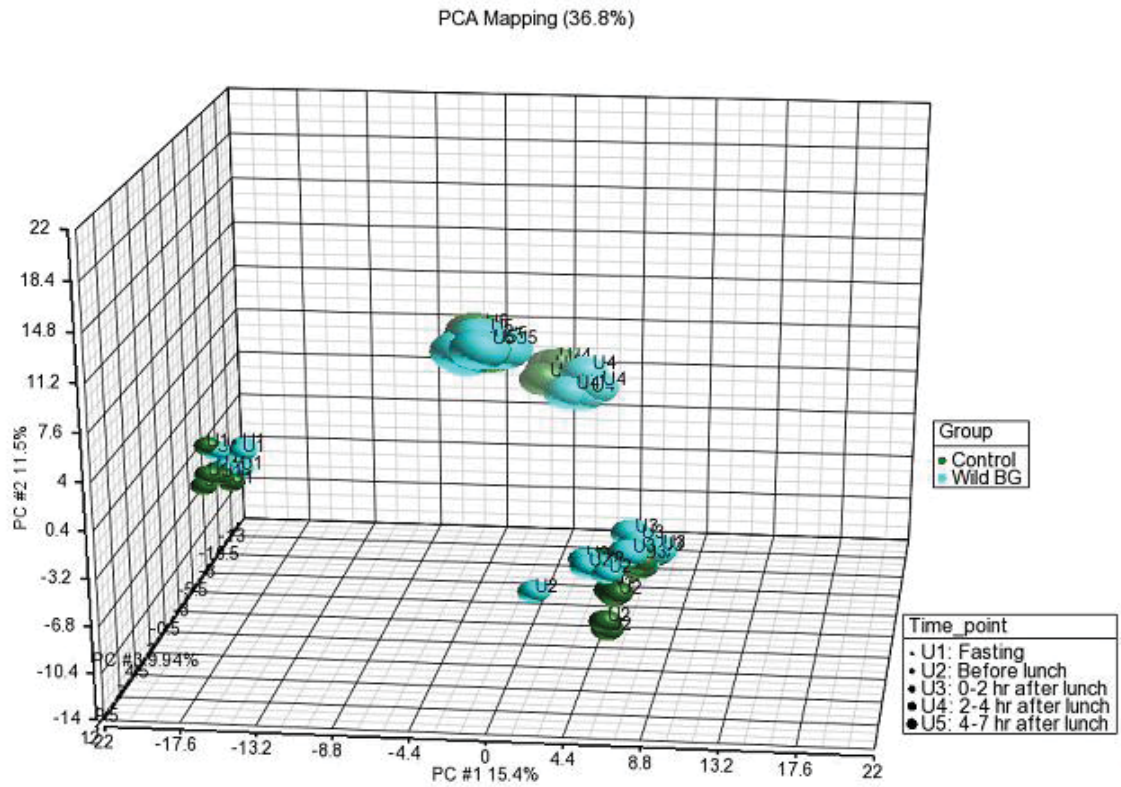
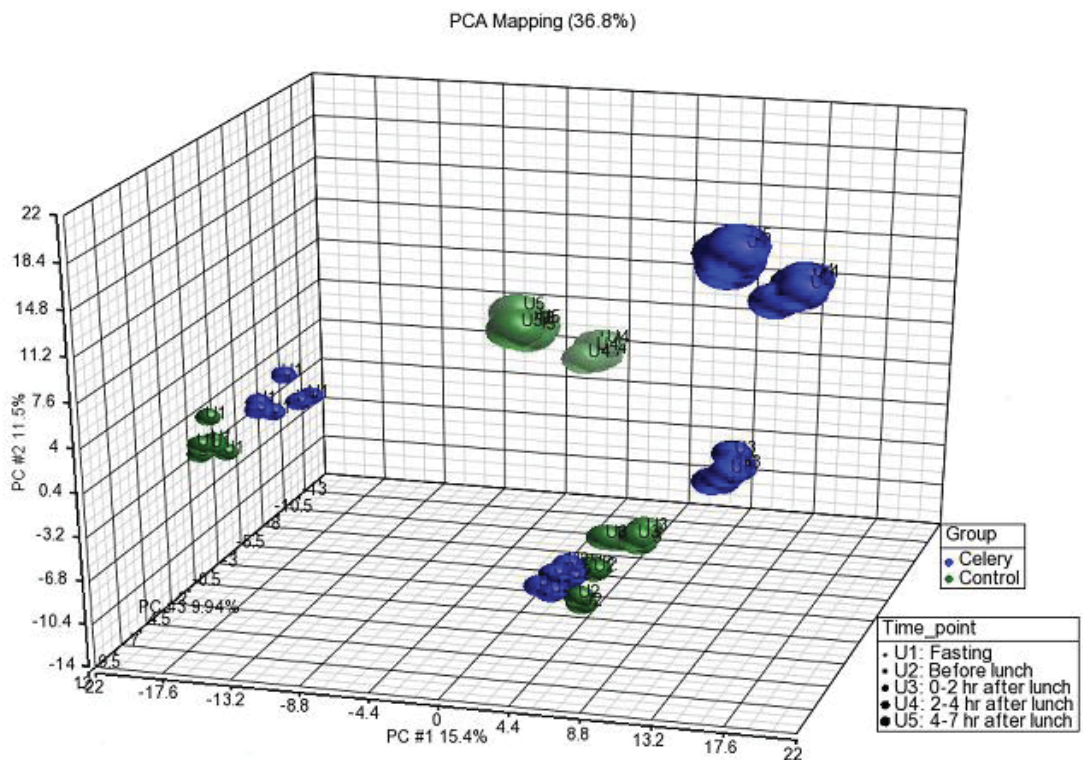


圖 3-8 以 PCA score plot 呈現尿液代謝體於 ESI+ 模式下所偵測到的代謝型態

(c) 山苦瓜組 vs. 對照組

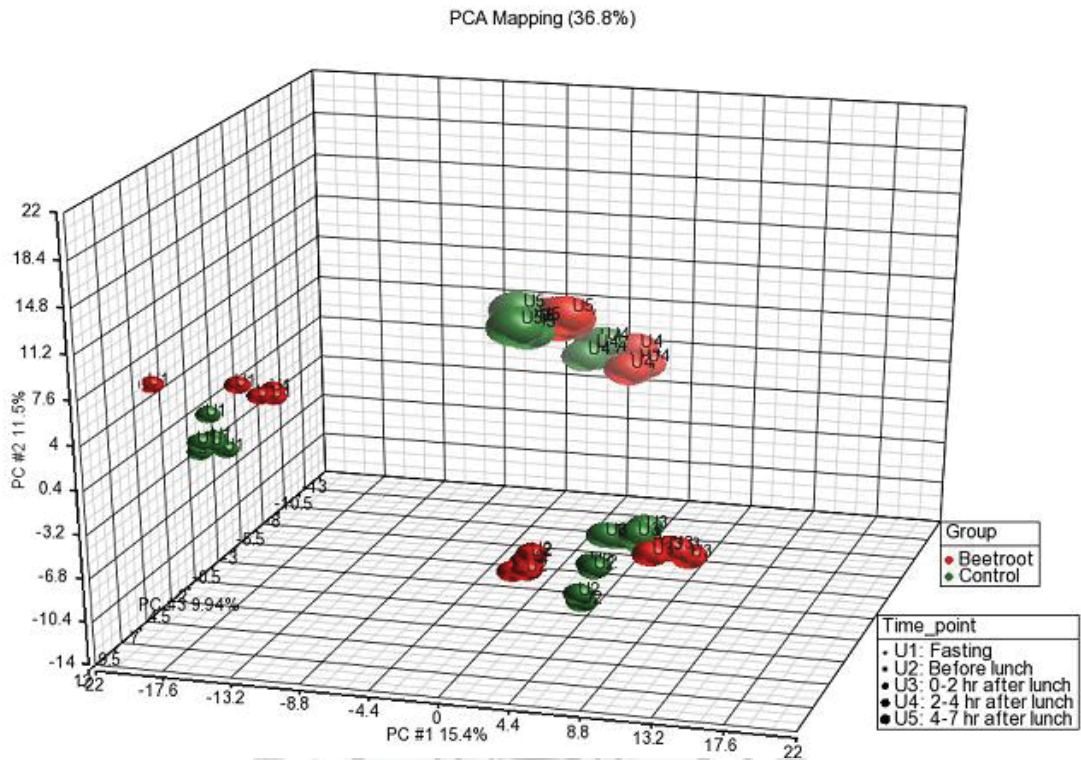


(d) 芹菜組 vs. 對照組

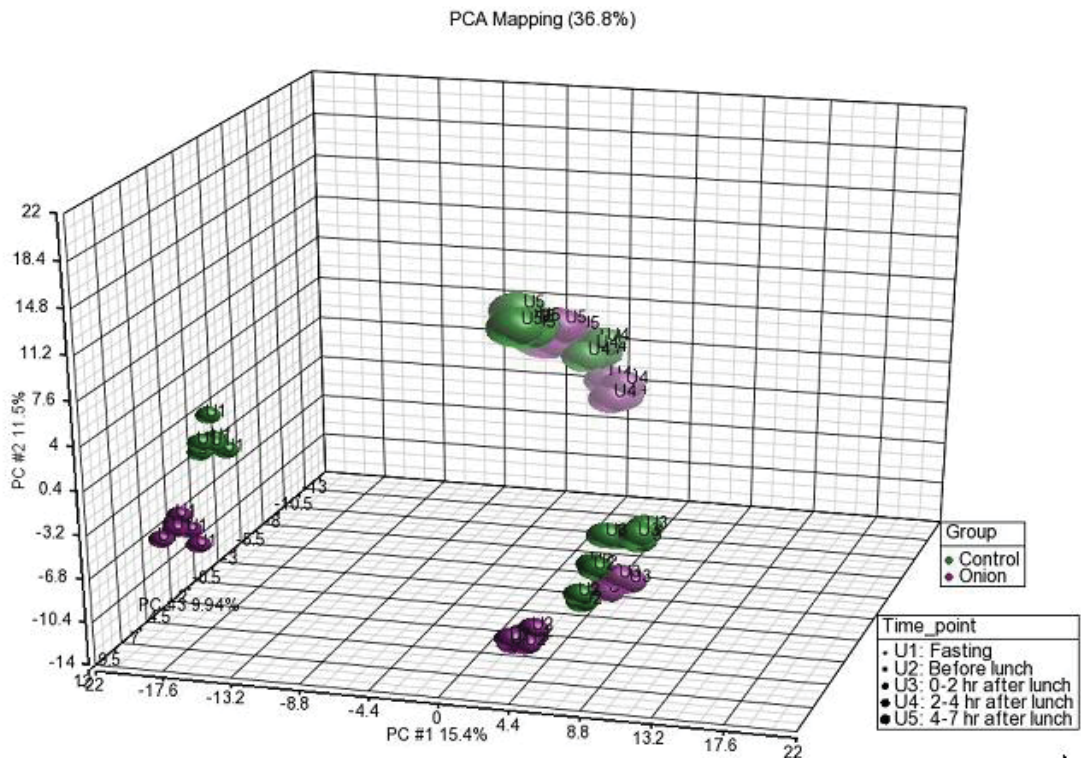


(續圖 3-8) 以 PCA score plot 呈現尿液代謝體於 ESI+ 模式下所偵測到的代謝型態

(e) 甜菜根組 vs. 對照組

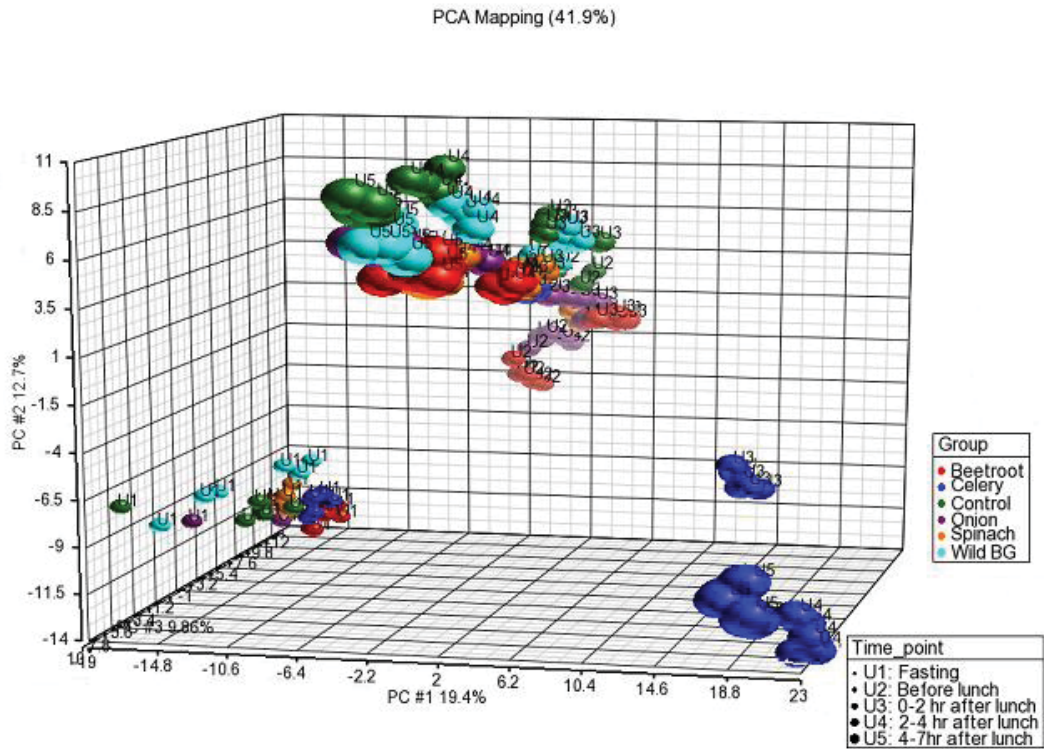


(f) 洋蔥組 vs. 對照組



(續圖 3-8) 以 PCA score plot 呈現尿液代謝體於 ESI+ 模式下所偵測到的代謝型態

(a) 所有組別



(b) 菠菜組 vs. 對照組

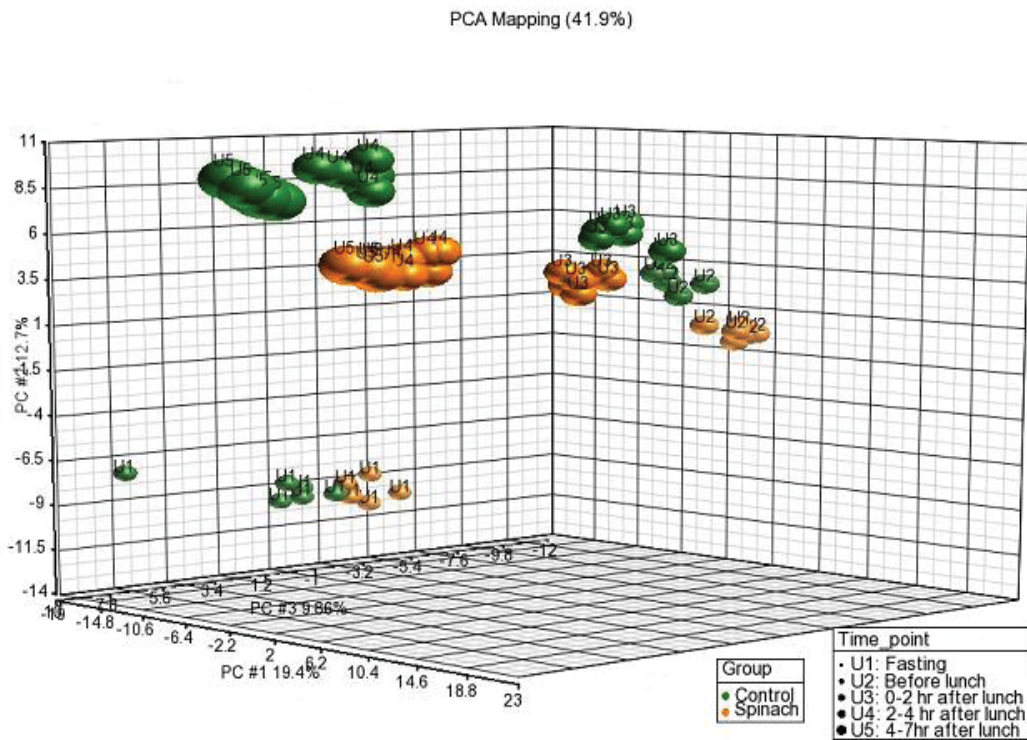
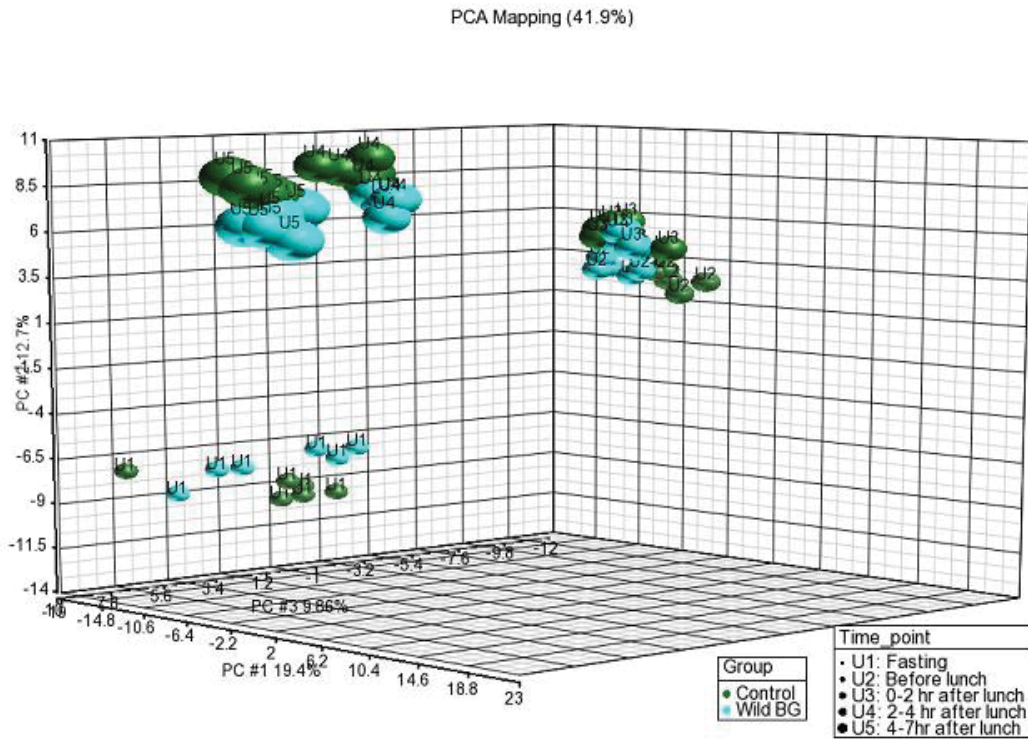
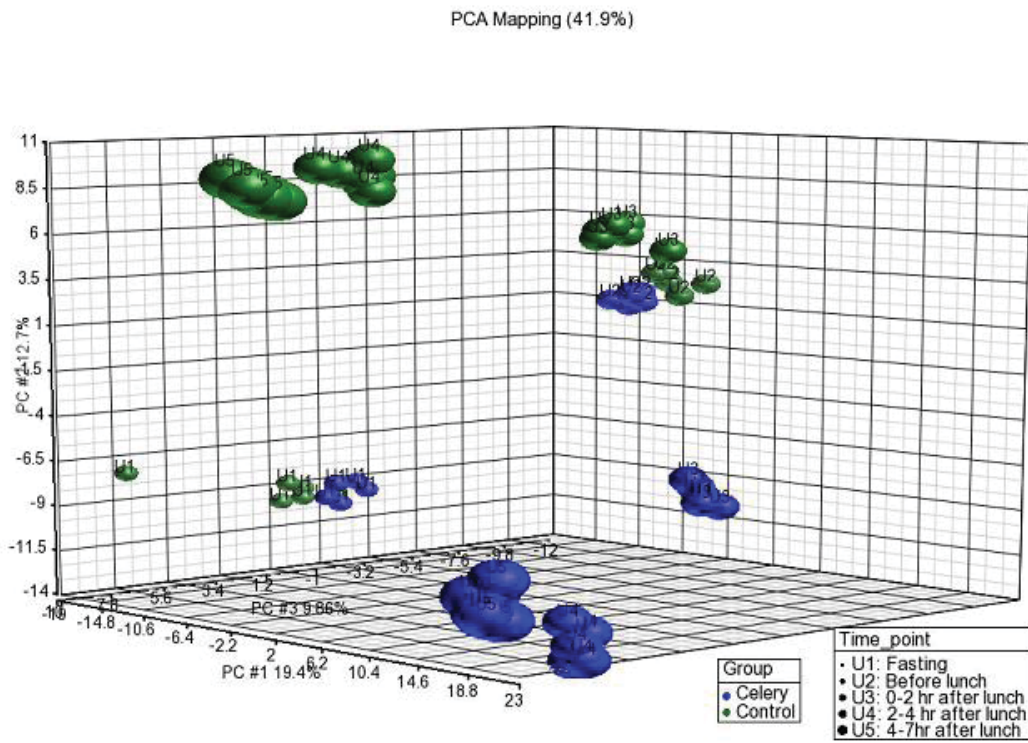


圖 3-9 以 PCA score plot 呈現尿液代謝體於 ESI-模式下所偵測到的代謝型態

(c) 山苦瓜組 vs. 對照組

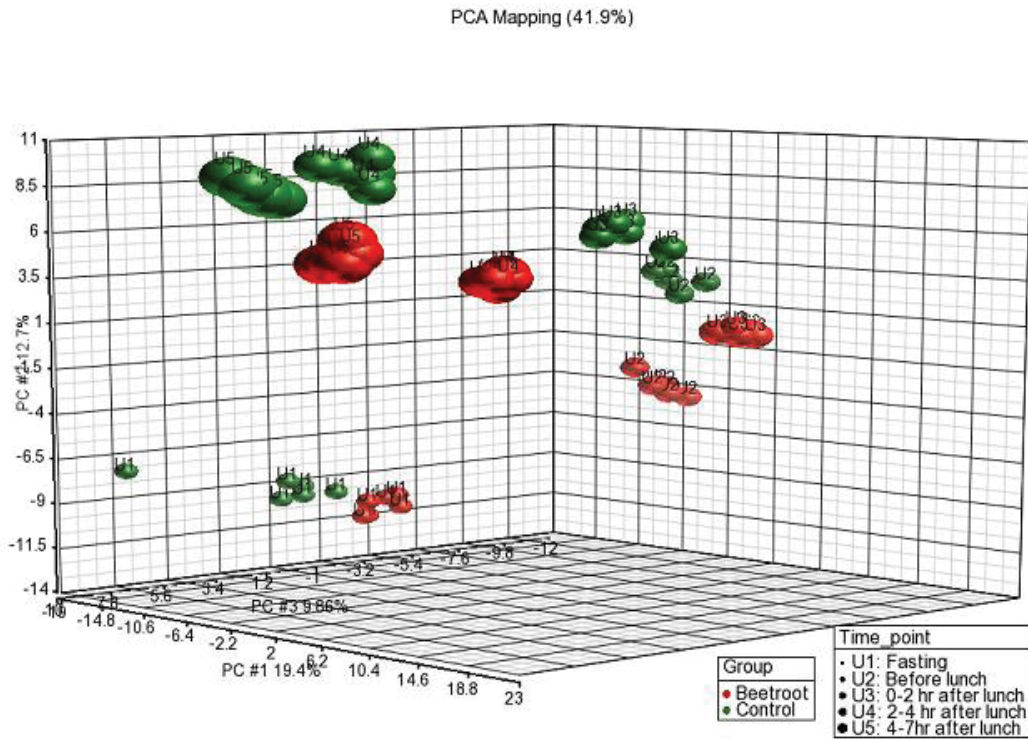


(d) 芹菜組 vs. 對照組

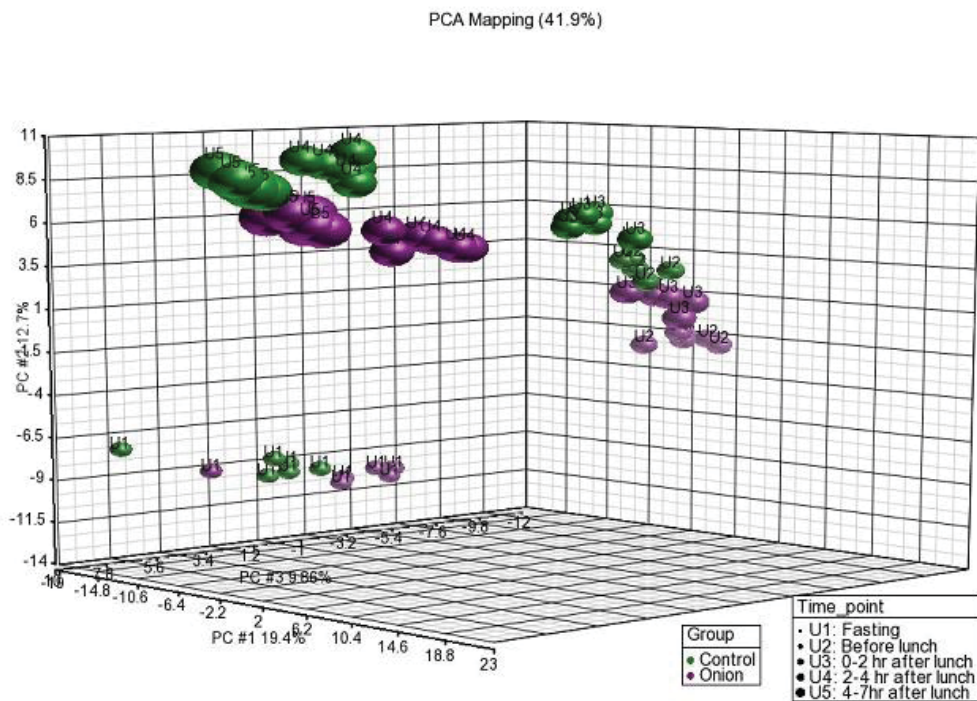


(續圖 3-9) 以 PCA score plot 呈現尿液代謝體於 ESI-模式下所偵測到的代謝型態

(e) 甜菜根組 vs. 對照組

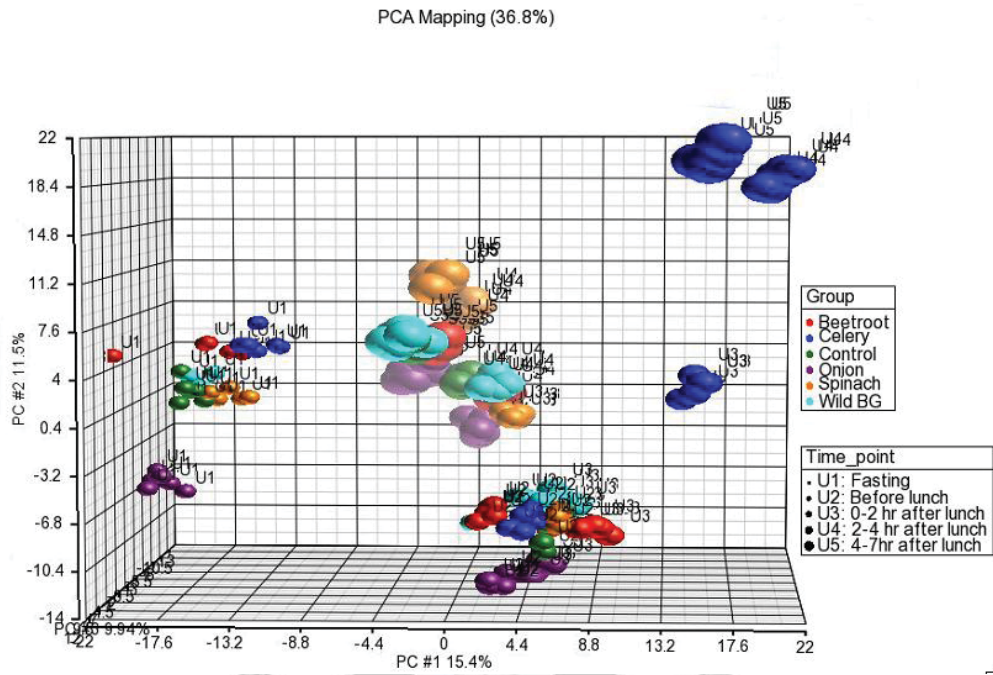


(f) 洋蔥組 vs. 對照組



(續圖 3-9) 以 PCA score plot 呈現尿液代謝體於 ESI-模式下所偵測到的代謝型態

(a) ESI+模式



(b) ESI-模式

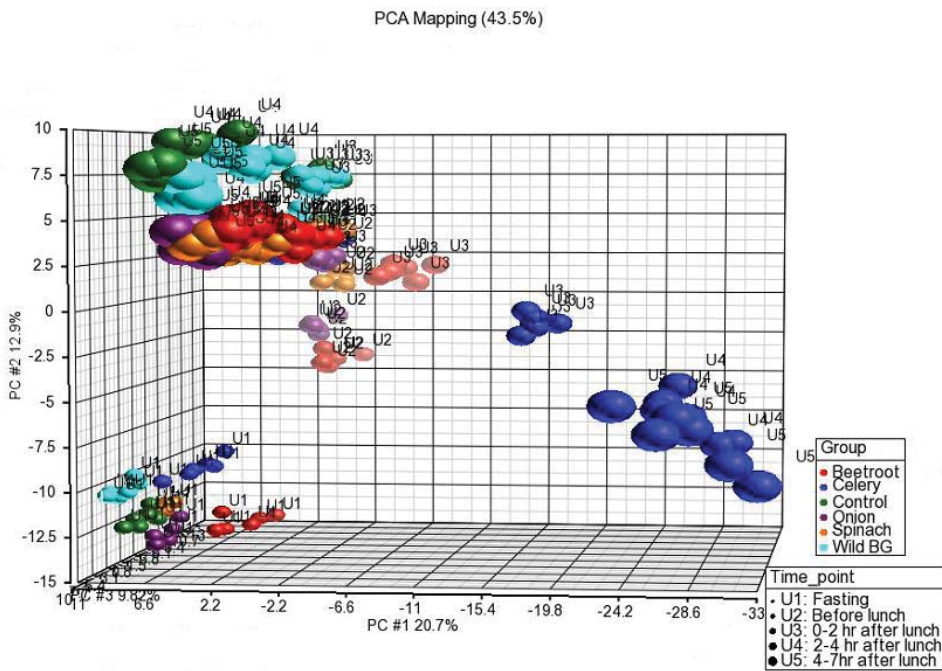
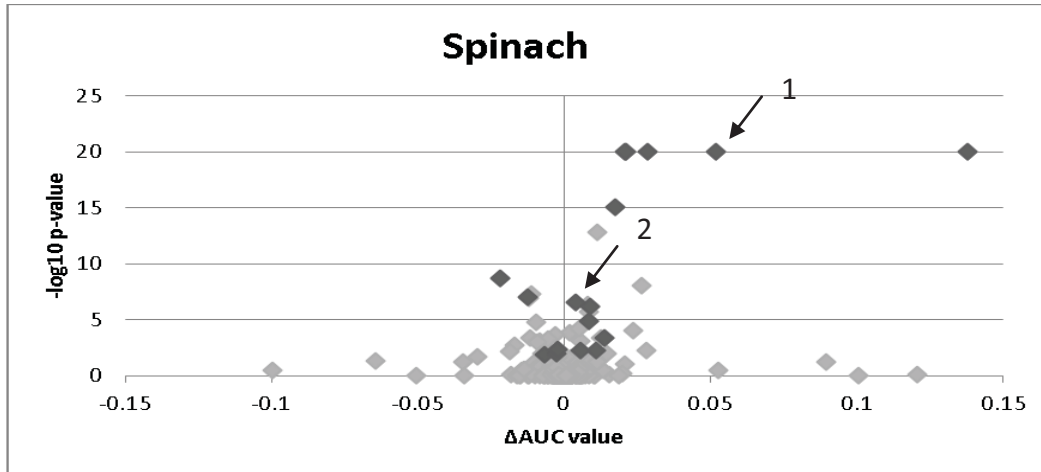
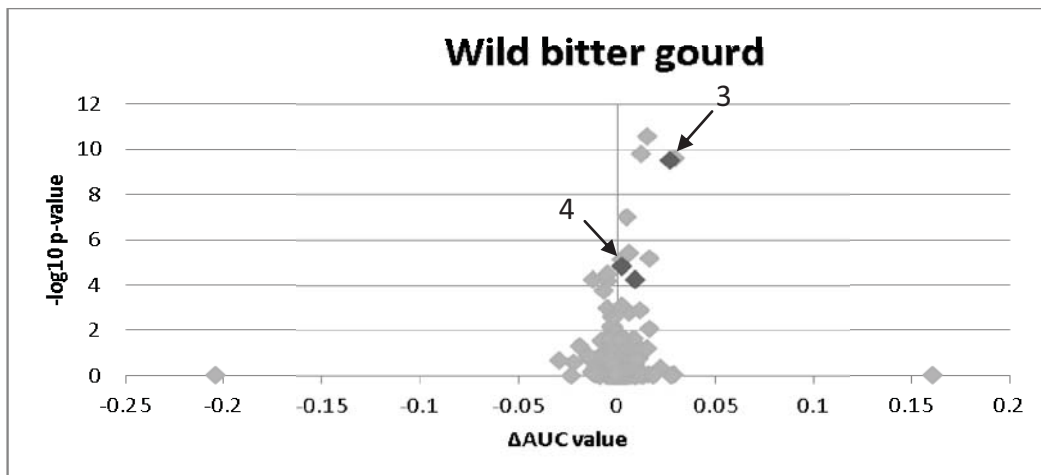


圖 3-10 重複測量檢體 (split sample)PCA 結果

(a) 菠菜組



(b) 山苦瓜組



(c) 芹菜組

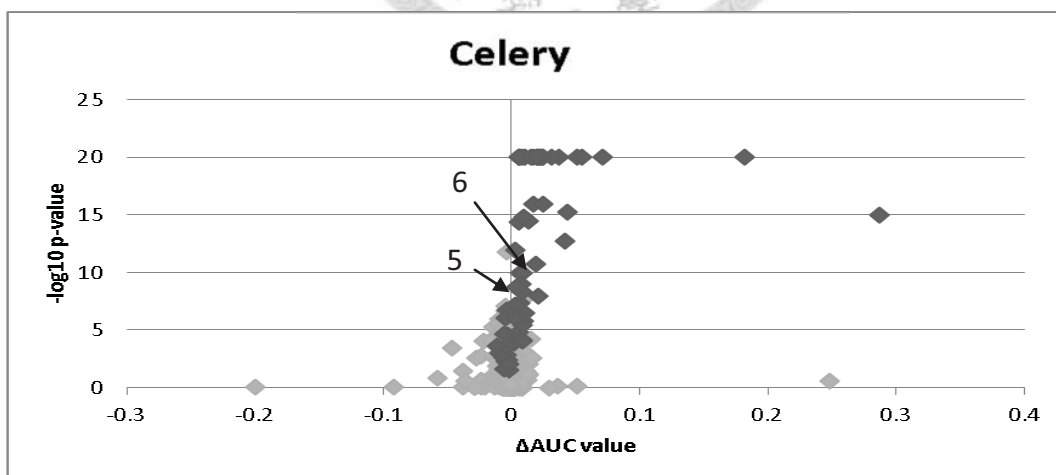
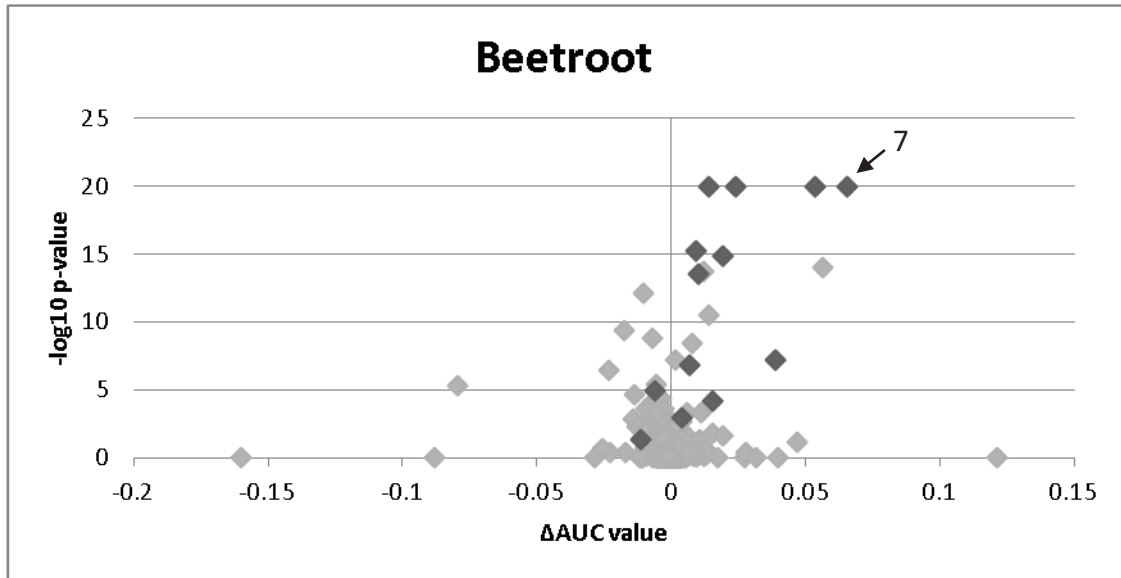
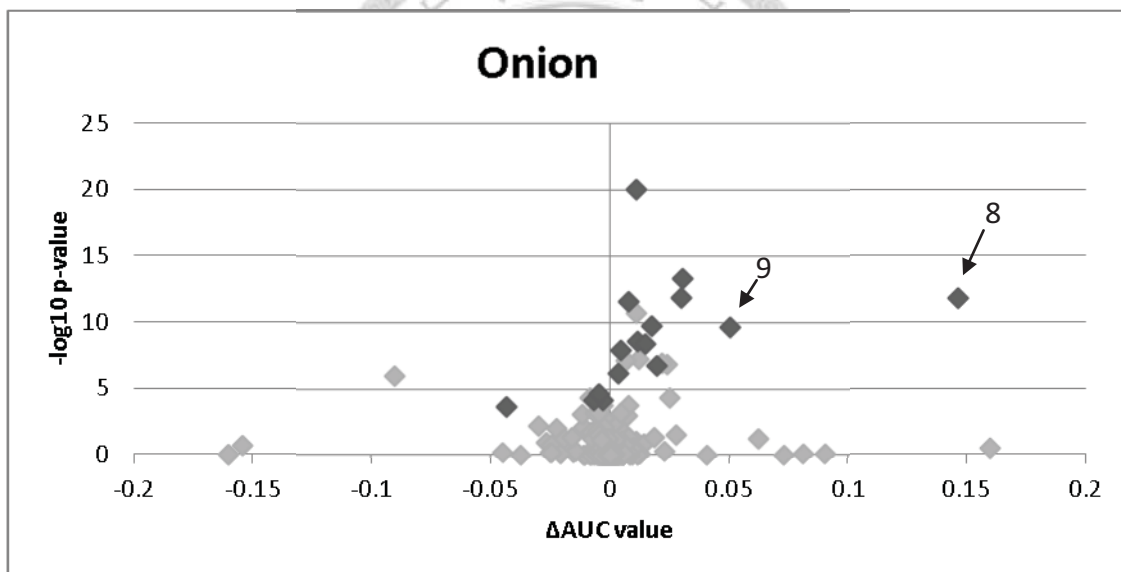


圖 3-11 不同蔬菜於 ESI+模式所測得的所有代謝物與對照組相較之差異顯著 (黑色點為該組別與其他組別以雪費事後檢定相較，皆有顯著差異之代謝物。橫軸為 net AUC 與對照組相差值，縱軸為檢定結果之 p 值。 p 值非常顯著者，因數值格式關係，已無法顯示，故將其 $-\log 10$ 值取 20 當作最大值。箭號所指者為有相關文獻所記載)

(d) 甜菜根組

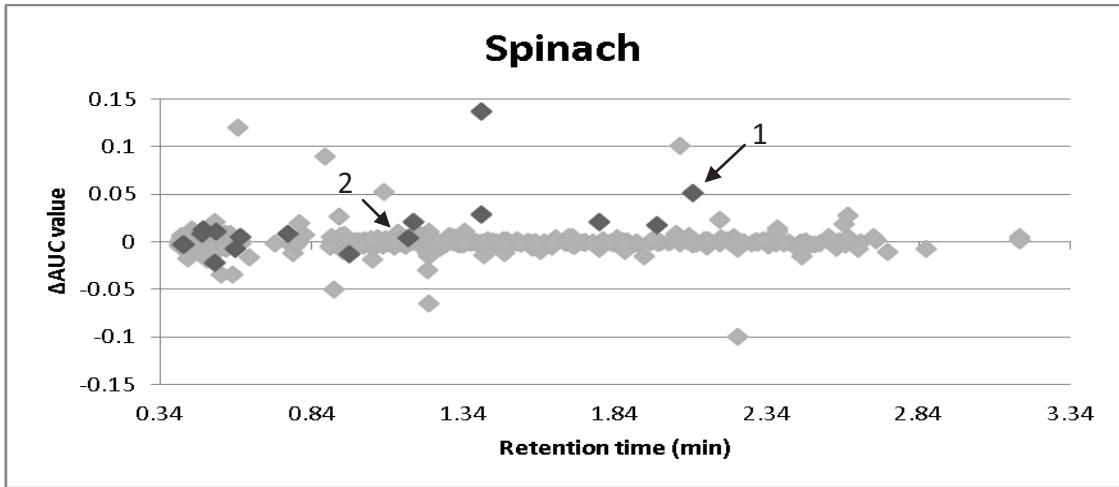


(e) 洋蔥組

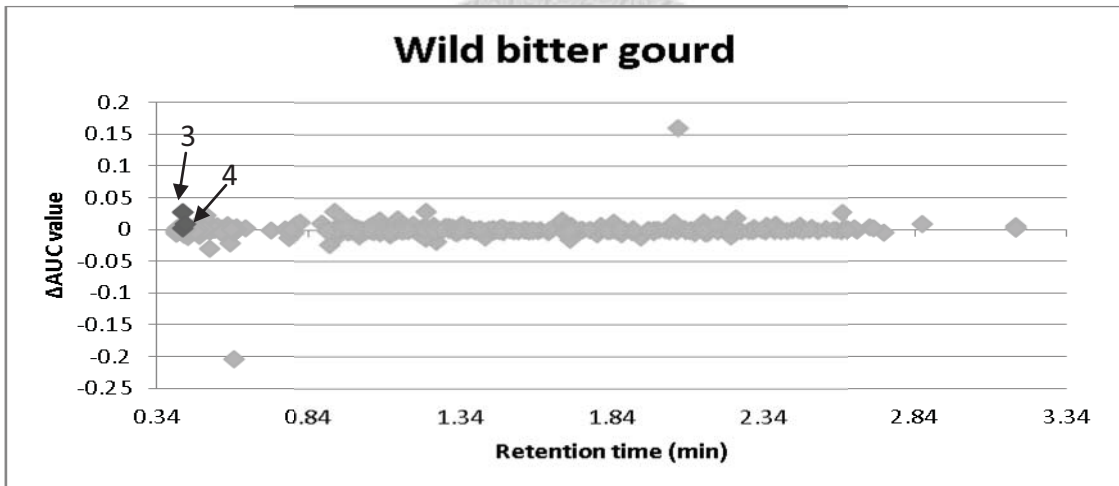


(續圖 3-11) 不同蔬菜於 ESI+模式所測得的代謝物與對照組相較之差異顯著 (黑色點為該組別與其他組別以雪費事後檢定相較，皆有顯著差異之代謝物。橫軸為 net AUC 與對照組相差值，縱軸為檢定結果之 p 值。 p 值非常顯著者，因數值格式關係，已無法顯示，故將其 $-\log_{10}$ 值取 20 當作最大值。箭號所指者為有相關文獻所記載)

(a) 菠菜組



(b) 山苦瓜組



(c) 芹菜組

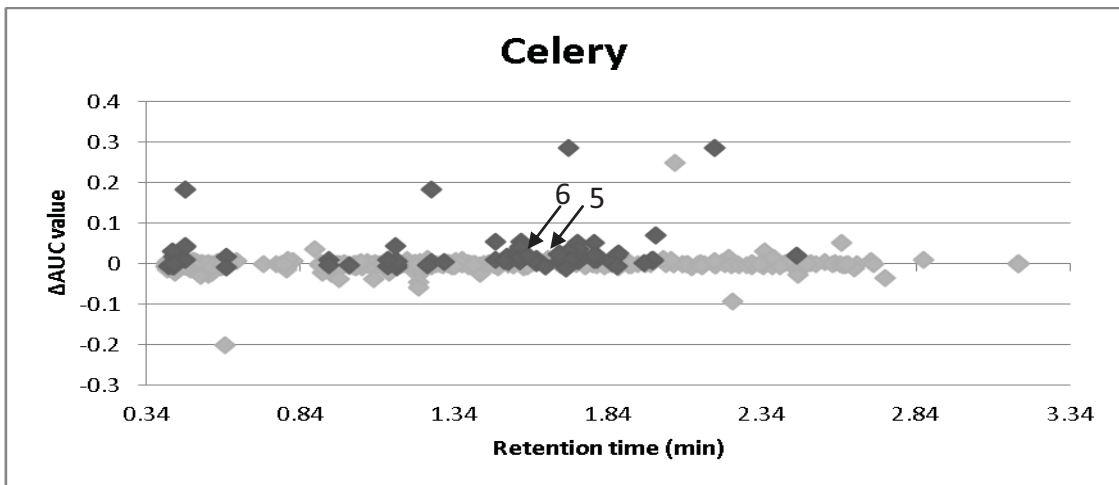
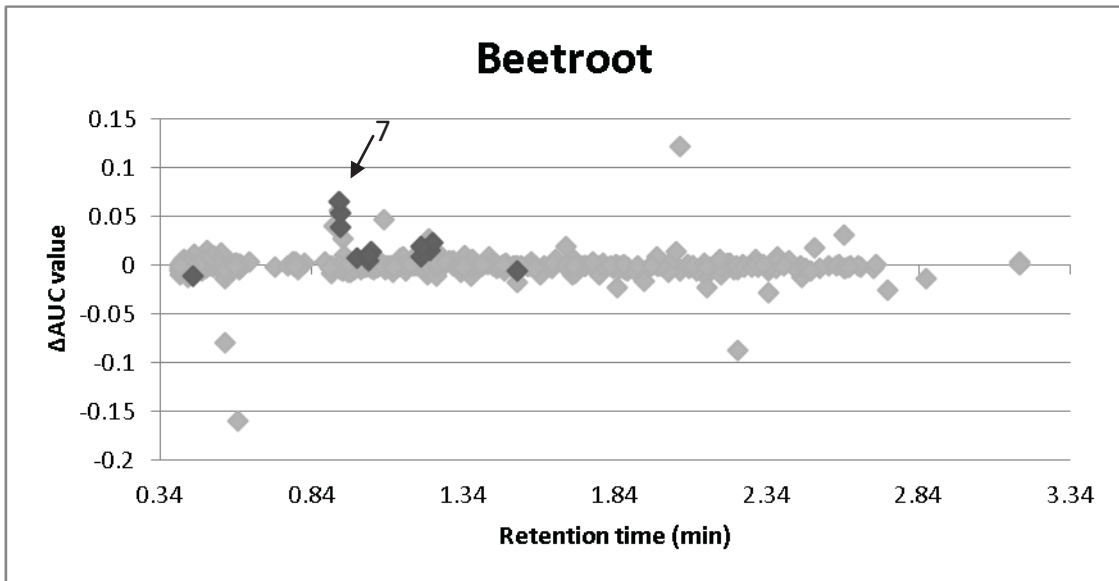
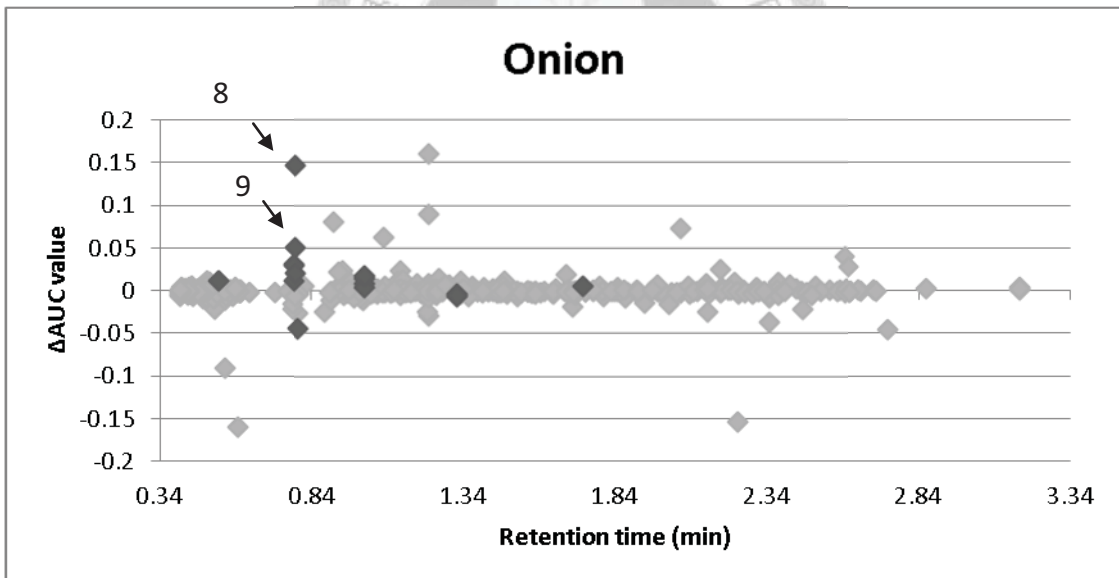


圖 3-12 不同蔬菜於 ESI+ 模式所測得的代謝物其滯留時間分布 (代謝物的餐後總變化量以 net AUC 值表示，並扣除對照組數值。橫軸為，縱軸為與對照組相差值。箭號所指者為有相關文獻所記載)

(d) 甜菜根組



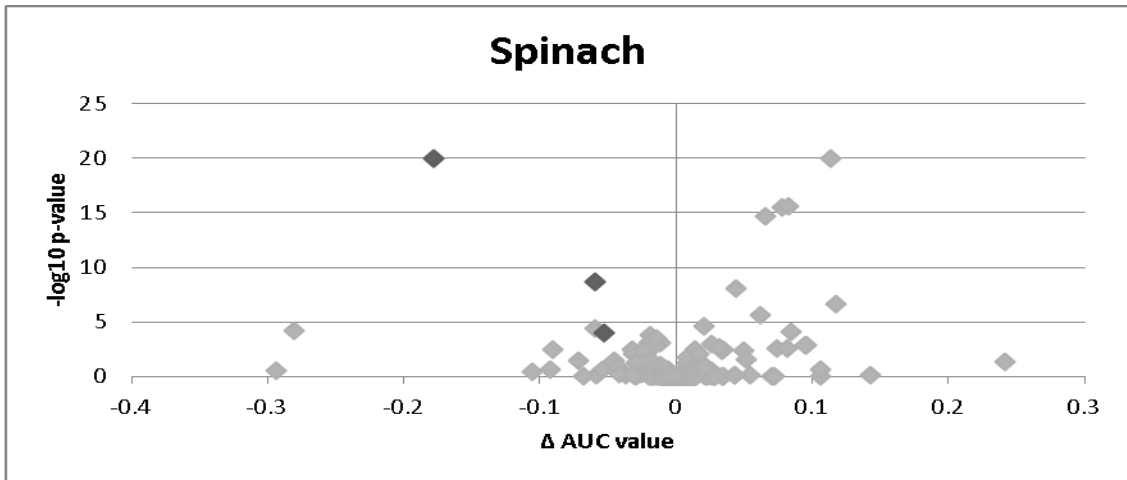
(e) 洋蔥組



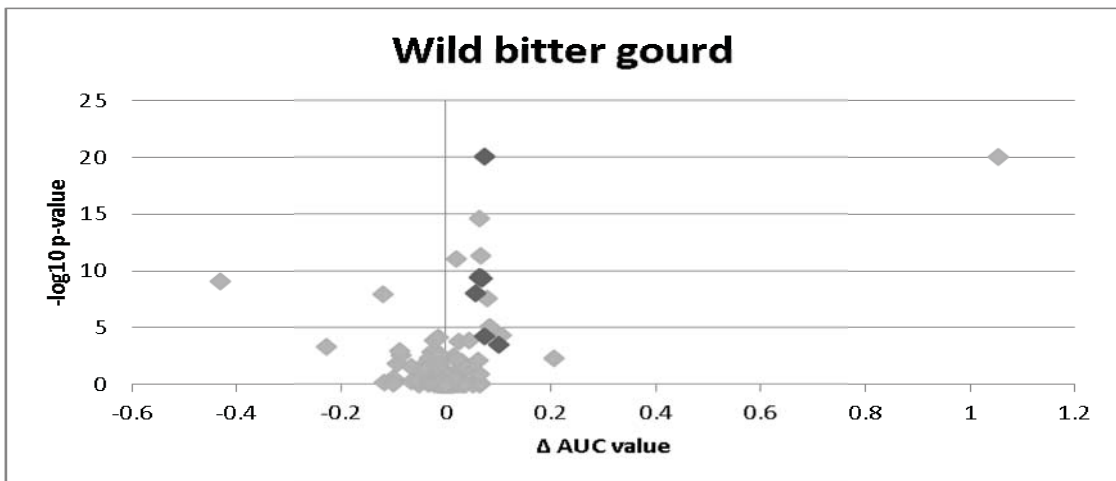
(續圖 3-12)不同蔬菜於 ESI+模式所測得的代謝物其滯留時間分布

(代謝物的餐後總變化量以 net AUC 值表示，並扣除對照組數值。橫軸為，縱軸為與對照組相差值)

(a) 菠菜組



(b) 山苦瓜組



(c) 芹菜組

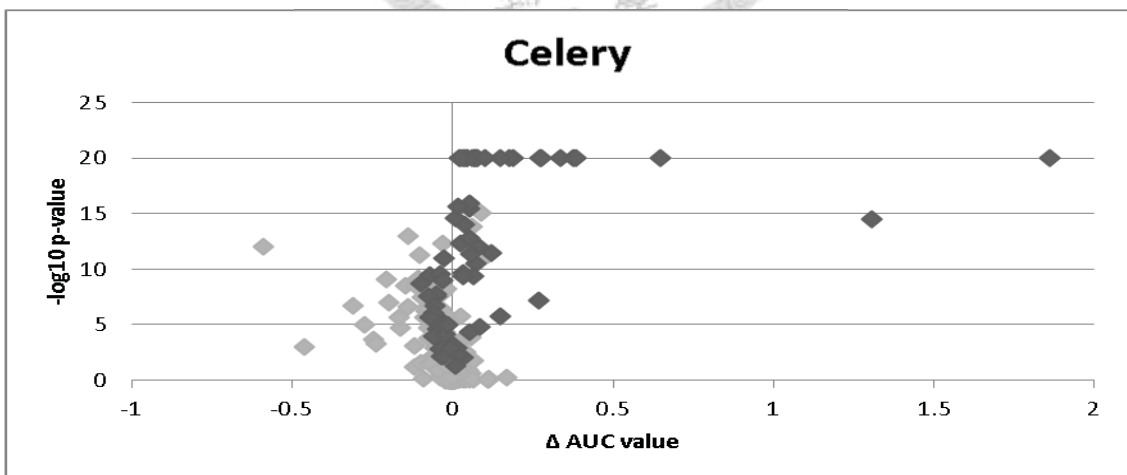
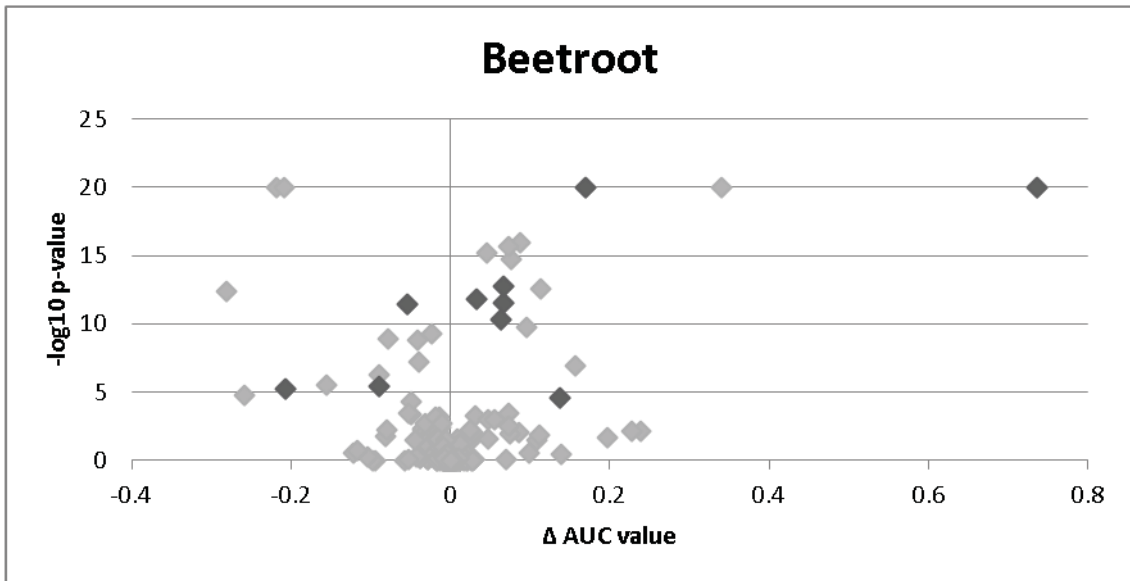
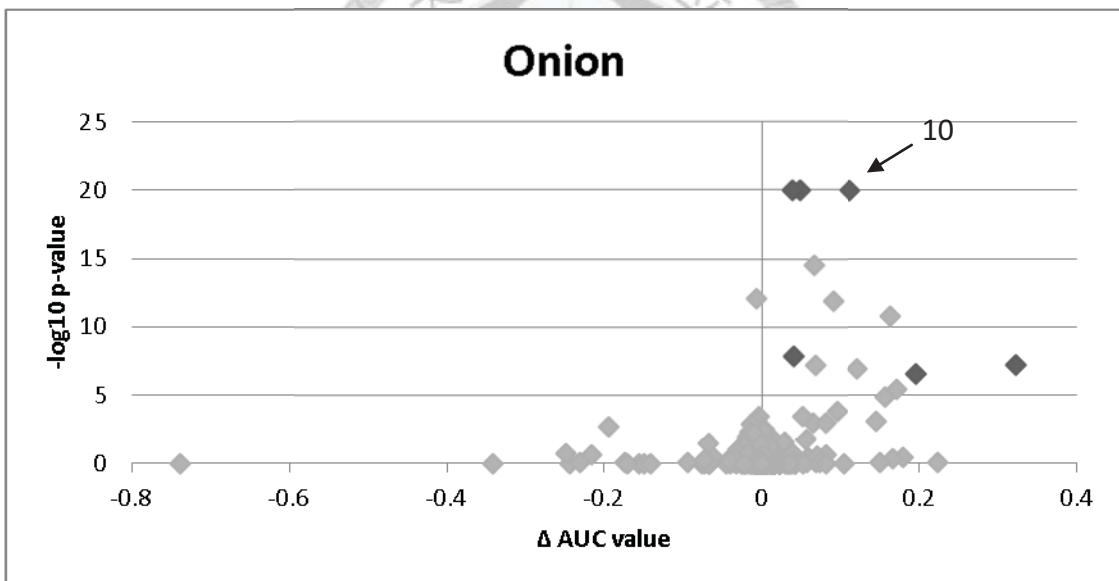


圖 3-13 不同蔬菜於 ESI-模式所測得的代謝物與對照組相較之差異顯著 (黑色點為該組別與其他組別以雪費事後檢定相較，皆有顯著差異之代謝物。橫軸為 net AUC 與對照組相差值，縱軸為檢定結果之 p 值。 p 值非常顯著者，因數值格式關係，已無法顯示，故將其 $-\log_{10}$ 值取 20 當作最大值。箭號所指者為有相關文獻所記載)

(d) 甜菜根組

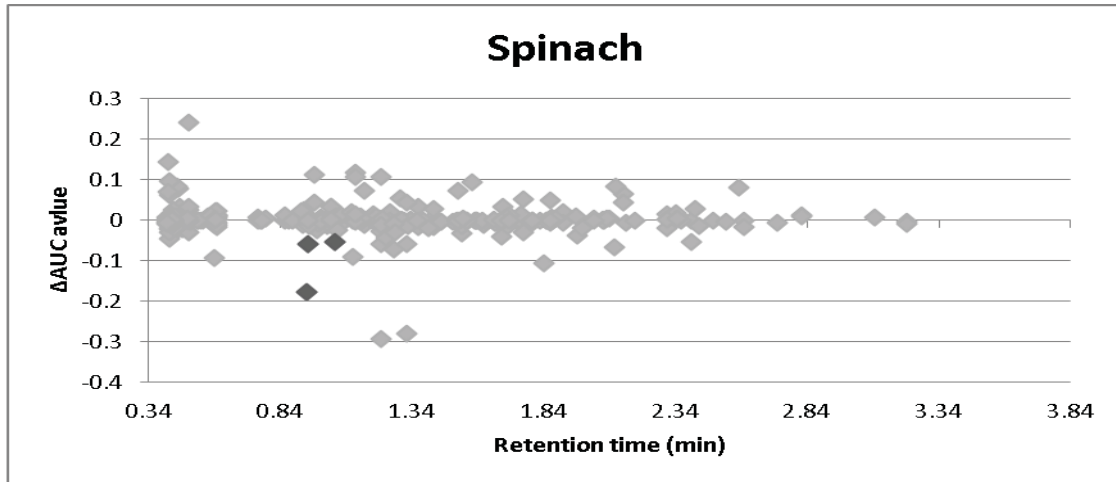


(e) 洋蔥組

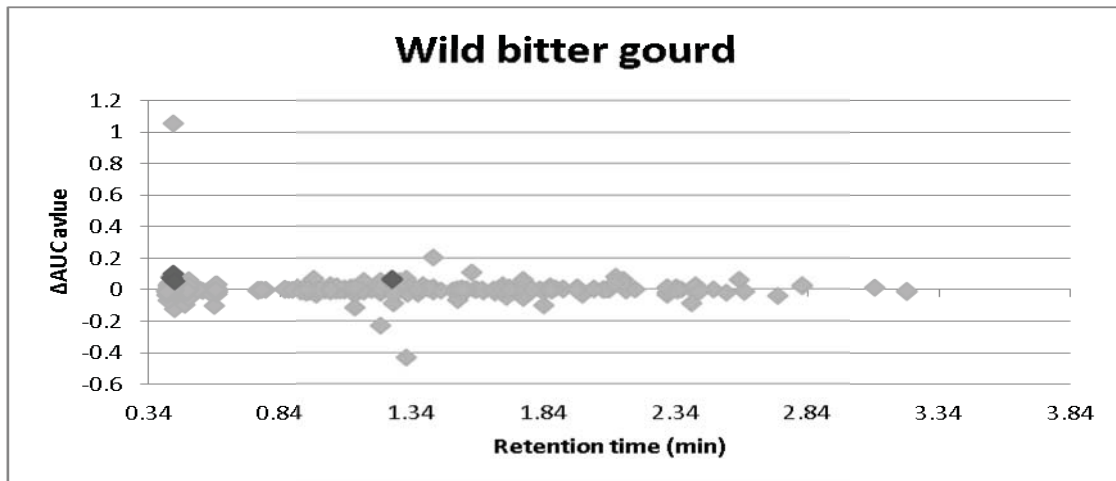


(續圖 3-13)不同蔬菜於 ESI-模式所測得的代謝物與對照組相較之差異顯著
(黑色點為該組別與其他組別以雪費事後檢定相較，皆有顯著差異之代謝物。橫軸為 net AUC 與對照組相差值，縱軸為檢定結果之 p 值。 p 值非常顯著者，因數值格式關係，已無法顯示，故將其 $-\log 10$ 值取 20 當作最大值。)

(a) 菠菜組



(b) 山苦瓜組



(c) 芹菜組

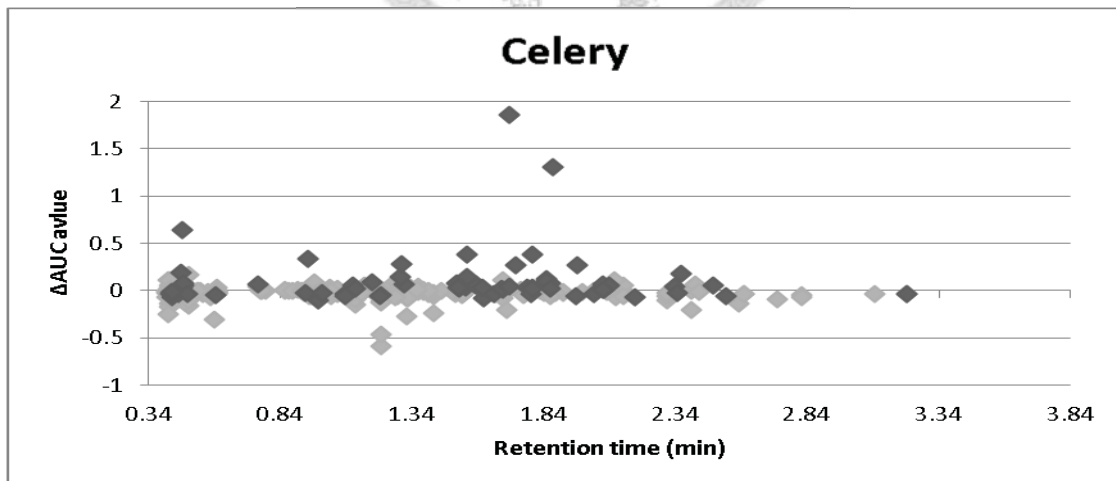
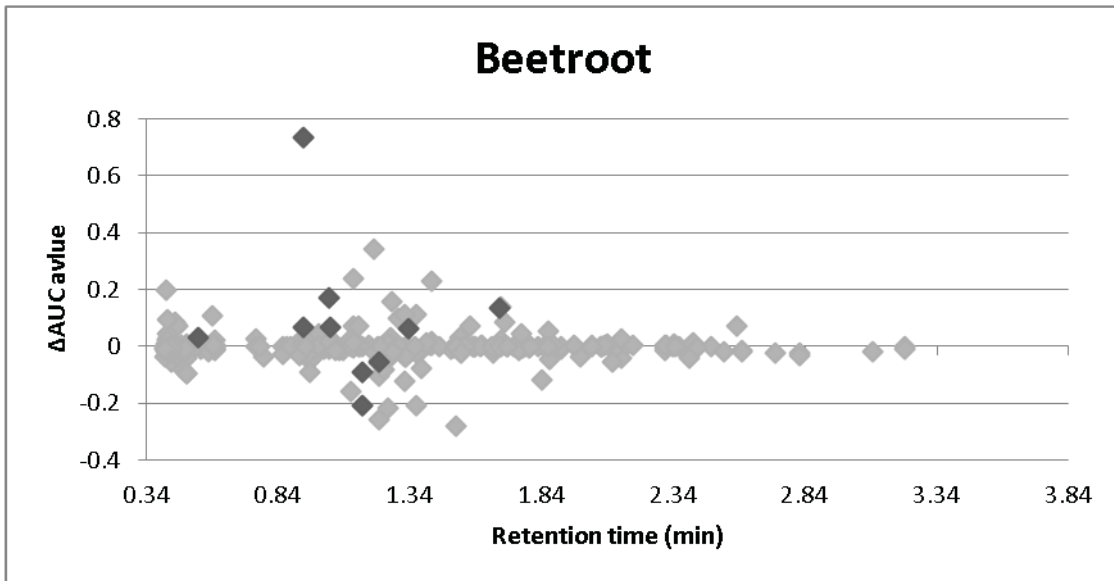
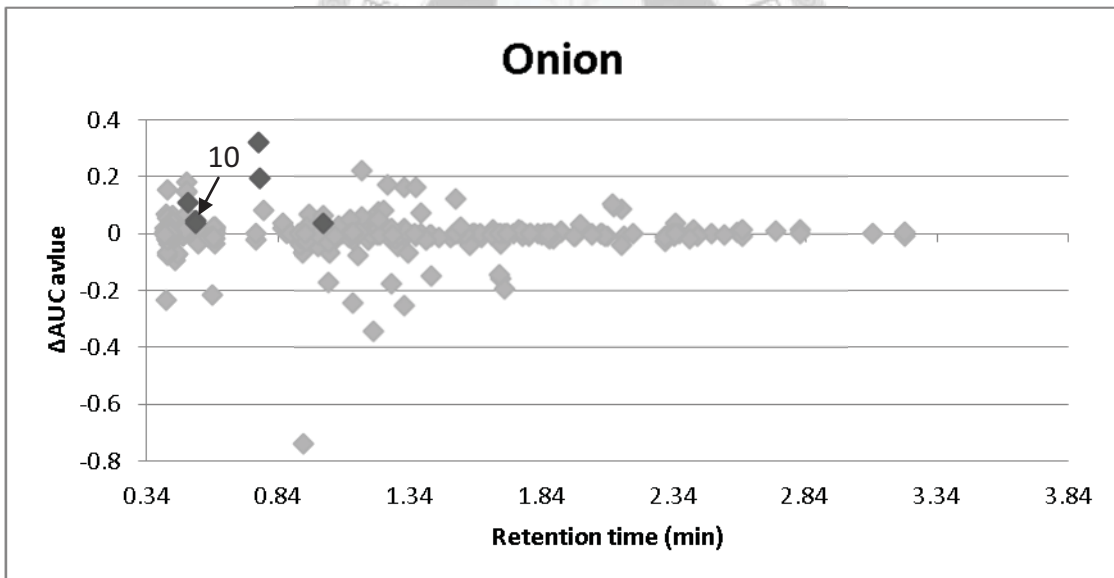


圖 3-14 不同蔬菜於 ESI-模式所測得的代謝物其滯留時間分布 (代謝物的餐後總變化量以 net AUC 值表示，並扣除對照組數值。橫軸為，縱軸為與對照組相差值)

(d) 甜菜根組



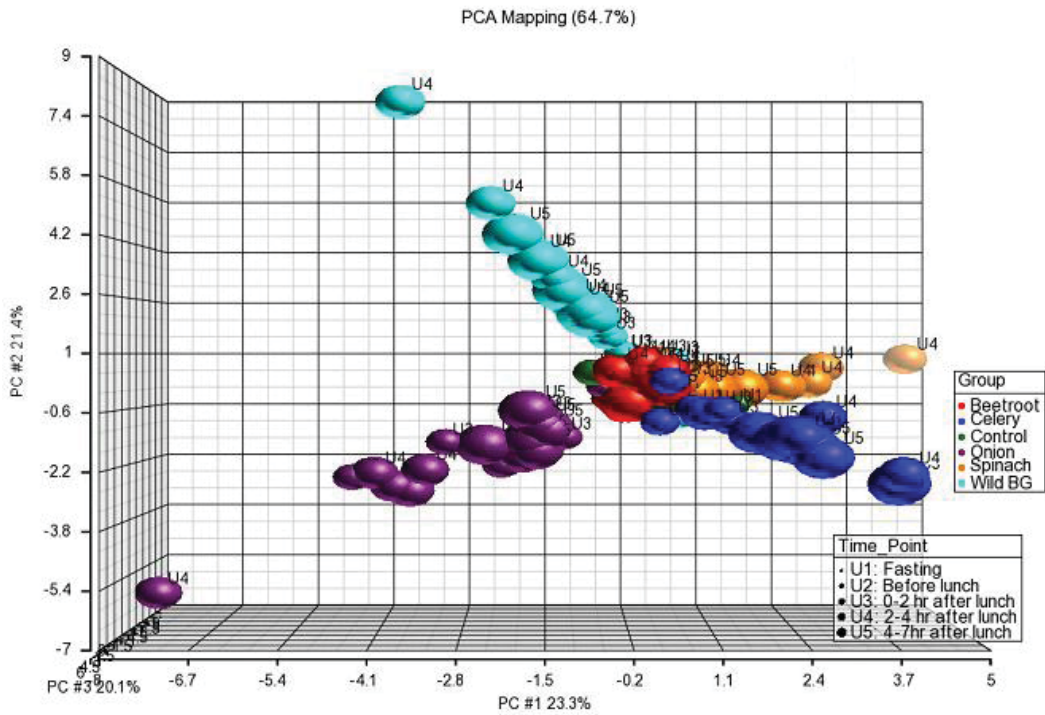
(e) 洋蔥組



(續圖 3-14)不同蔬菜於 ESI-模式所測得的代謝物其滯留時間分布

(代謝物的餐後總變化量以 net AUC 值表示，並扣除對照組數值。橫軸為，縱軸為與對照組相差值)

(a) 所有時間點



(b) 餐後 2-4 小時

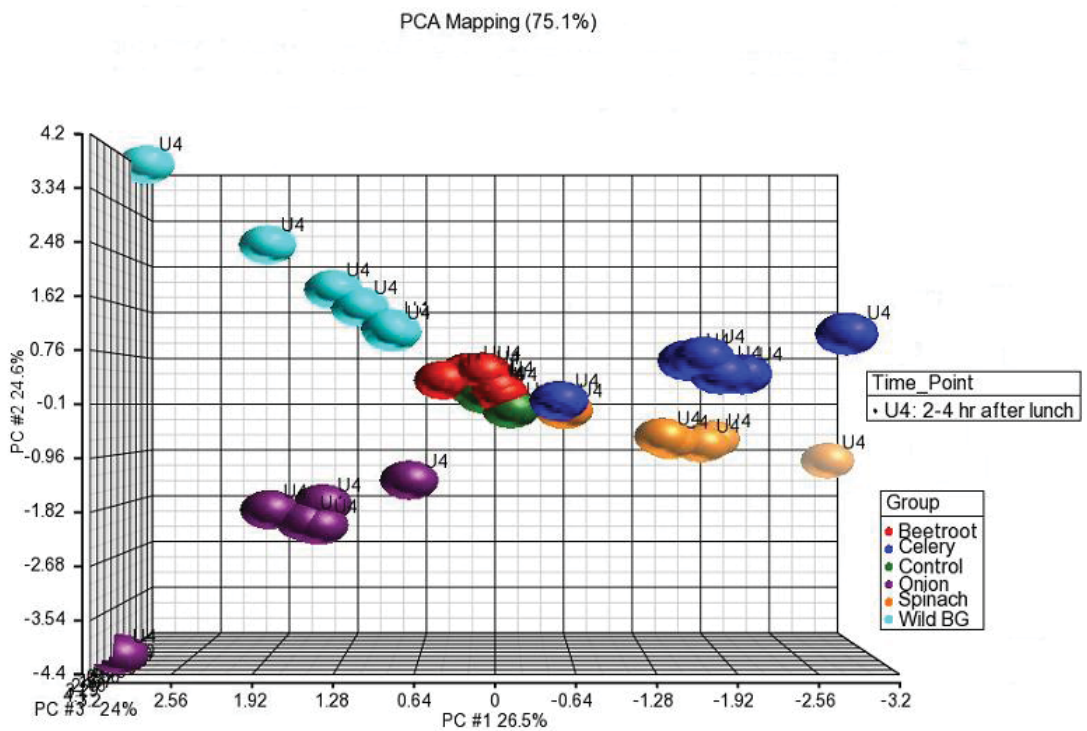


圖 3-15 以 PCA 結果呈現經過挑選的代謝物(10 個)於 ESI+模式下其表現型態

表 3-5 代謝物初步鑑定結果

No.	RT (min)	Detected Mass	Metabolite putative identification	Ionization product	Database
Spinach					
1	2.0971	182.1287	fenuron kynuramine	[M+NH ₄] ⁺ [M+NH ₄] ⁺	KEGG HMDB
2	1.1565	167.1068	perillic acid/ myrtenic acid/ rotundifolone	[M+H] ⁺	HMDB/ KEGG
Wild bitter gound					
3	0.4237	219.0473	cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrodibenzothiophene coniferyl alcohol gluconic acid/ gulonic acid/ mannonate/galactonate/altronate	[M+H] ⁺ [M+K] ⁺ [M+Na] ⁺	KEGG KEGG KEGG
4	0.4333	241.0299	cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrodibenzothiophene gluconic acid/ gulonic acid/ mannonate/galactonate/altronate	[M+Na] ⁺ [M+2Na-H] ⁺	KEGG KEGG
Celery					
5	1.68	173.0971	carvone	[M+Na] ⁺	KEGG
6	1.5521	191.1069	geranic acid	[M+Na] ⁺	KEGG
Beetroot					
7	0.931	234.0428	betalamic acid	[M+Na] ⁺	KEGG
	0.9331	232.027	betalamic acid	[M+Na-2H] ⁻	KEGG
Onion					
8	0.7861	130.0495	L-pyroglutamic acid (R)-(+)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid	[M+H] ⁺ [M+H] ⁺	HMDB HMDB
9	0.7862	88.0391	2-aminoacrylate	[M+H] ⁺	HMDB
10	0.4988	176.0386	alliin/ isoalliin	[M-H] ⁻	KEGG

第四章 討論

第一節 試驗設計與方法

一、標準化飲食

過去研究指出人體代謝體受到許多因子的影響，包括基因、年齡、性別、身體狀態及飲食型態和體能活動[75-77]，然而許多研究指出提供標準飲食使人體代謝體達到常態化，能夠將個體內變異降到最低[65, 78, 79]。因此本次研究設計一天的全天性標準化飲食，希望可以能夠達到降低個體內變異，但由於此次實驗結果為混合檢體(pooling sample)的呈現，故仍需以個別檢體分析的資料作進一步確認。

二、測量時間

本此研究收集時間為五個時間點，分別為空腹、午餐前、午餐後 2 小時內、午餐後 2-4 小時以及午餐後 4-7 小時由於尿液排放速率與攝取水分量相關，若要進行較密集的測量會有執行上的困難。而 Favé 等人[80]的研究，探討了在試驗餐後以不同時段的方式收集尿液，對其結果的影響。他們設計了三種尿液收集方式，分別為(1)僅在試驗餐後 3 小時收集一次尿液、(2)餐後每間隔 1.5 小時收集尿液以及(3)每間隔 2 小時收集尿液。其結果顯示當把這三種方式收集到的尿液代謝體數據以 PCA 的方式呈現時並無顯著差異，顯示進行尿液代謝體的收集時，能夠有一個彈性的“time window”。而本次研究在 PCA 的分析結果，可以看到代謝物的變化由餐後開始增加直至餐後第 7 小時為接近空腹狀態，且午餐後 2-4 小時達到最大的差異，顯示本次試驗收集的尿液點間隔為可行的設計。

三、曲線下面積的計算方式

在臨床試驗當中常用曲線下面積(Area under curve, AUC)評估一段時間內體內代謝物濃度的反應變化，其特色是能夠將多次測量的數值轉換為一個新的評估指標(index)。Glycemic index (GI)即為一個常見的應用，比較受測食物與參考食物的

血糖上升面積計算 GI 值以評估食物中所含醣類對於人體血糖值變化的影響[81]。

公式如下：

$$GI = \frac{\text{攝食含有 50 公克醣類的受測食物的血糖上升面積}}{\text{含有 50 公克碳水化合物的參考食物(葡萄糖或白土司)的血糖上升面積}} * 100\%$$

AUC 主要以 trapezoidal rule 為原則進行計算，依據不同定義可衍生出許多算法，而不同的計算方式可能會影響實驗的結果以及結果推論[82, 83]。Cardoso[84]等人的研究，挑選較常用的三種 AUC 計算方式(圖 5-1)進行比較，其研究結果顯示：positive AUC 與 net AUC 以相對基線值的方式來計算能夠控制不同個體間的變異度，而 total AUC 與 positive AUC 這兩個算法的結果以及推論較為相似。

本研究另外計算 total AUC 及 positive AUC 的結果進行統計分析，與 net AUC 結果進行比較。結果發現在本研究以不同 AUC 計算方法，找到各組中與其他組別表現相異的代謝物重複率高(圖 5-2)，其原因可能為偵測到的代謝物大多屬於外生性的物質，且如果代謝物餐後沒有低於基線的數值，則 net AUC 及 posAUC 兩種方式算出來的結果會相同。

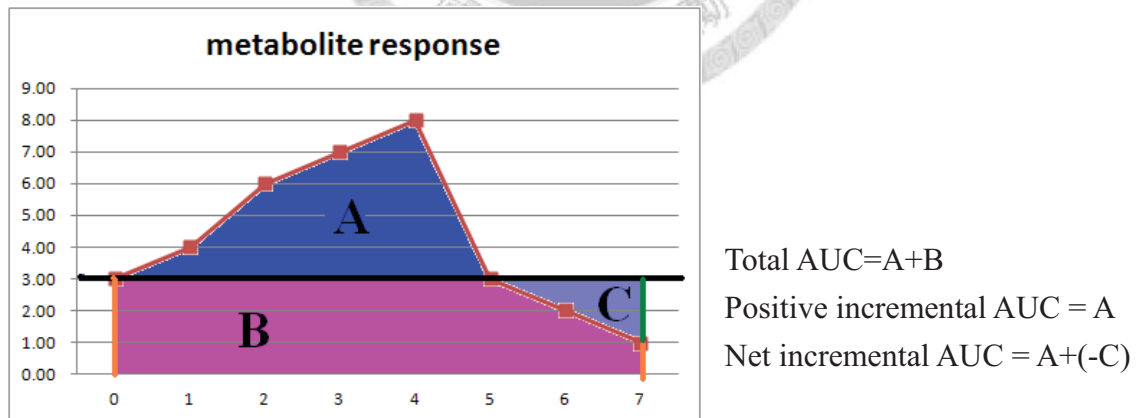


圖 4-1 不同的曲線下面積算法

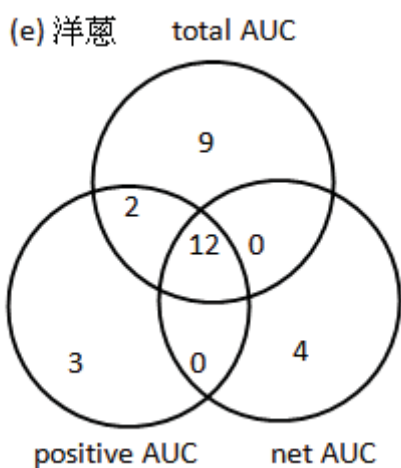
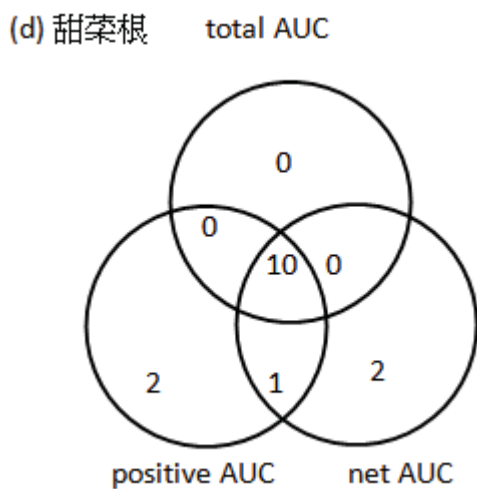
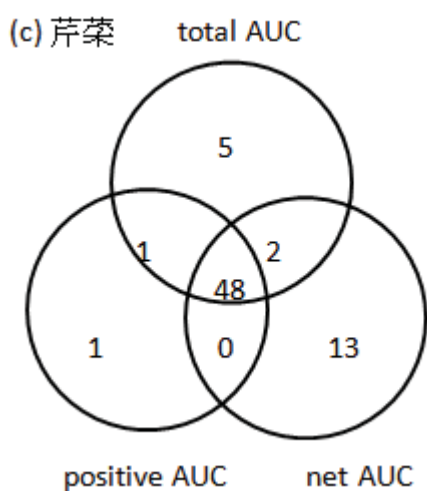
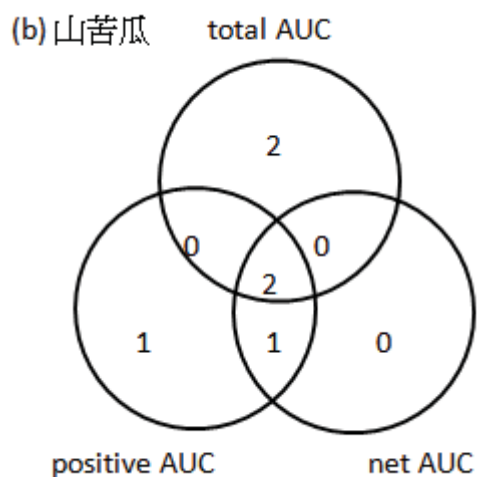
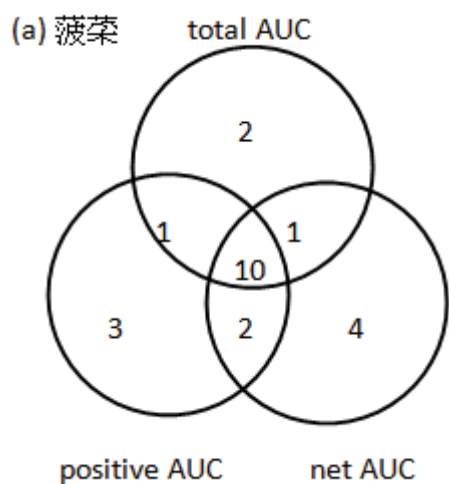


圖 4-2 以 3 種不同的曲線下面積算法所得的結果比較 (以 ES+模式結果為例)

第二節 目前結果

一、血壓

菠菜與甜菜根在結果當中顯示與對照組相較能顯著降低收縮壓的上升，而洋蔥顯著降低舒張壓的上升。菠菜降血壓的機制可能來自於其鉀的含量，每 100g (精) 生重菠菜能夠提供 499.85 mg 的鉀，屬於高鉀蔬菜，由尿液中礦物質的排出量也可看到菠菜組的鉀排出量顯著較對照組來的多。Kapil 等人[85]的研究顯示給予正常血壓的受試者 250 mL 甜菜根汁，能夠使收縮壓顯著下降 5.4 ± 1.5 mm Hg，舒張壓和心跳速率則無顯著影響，則與本次實驗結果一致。而洋蔥被認為降血壓的機制之一是透過增加體內硝酸鹽以及亞硝酸鹽代謝物，以及提高 nitrous oxide systems (NOS) 活性達到降血壓的成效[86]。另一方面，洋蔥富含槲黃素(querletin)也具有降血壓的成效; Edwards 等人 [87]的研究指出每天給予 730mg 的槲黃素，可使高血壓第一期的患者降低收縮壓 7 mmHg、舒張壓 5 mmHg。

芹菜在過去被認為是降血壓蔬菜，但在本次研究卻發現午餐後的收縮壓變化卻是較對照組顯著增加。原因可能是芹菜的午餐前血壓偏低，將午餐後的血壓扣除基線值，使得血壓值上升的差異增加，而達到顯著差異。

二、血糖及胰島素濃度

由圖 3-1 的整體趨勢來看，大部分的組別於午餐前即達到很高的濃度，表示在吃完早餐兩小時後，血糖並未回復至一般的水平，而這樣的情況使得原先期望看到午餐後血糖的代謝型態產生了干擾。而山苦瓜組在餐前的血糖值與胰島素值皆為較低的狀況，而餐後 1 小時達到最大值，因此血糖及胰島素部分是以空腹基線值進行比較。

三、血液中脂質的變化

以整體血脂的變化來看趨勢來看，三酸甘油酯、LDL 以及 HDL-C 的變化約在餐後 2-3 小時即達到變化的最大量。過去的研究指出，蔬菜當中因含水溶性纖維以及能改善血脂狀況[88]，而植物固醇能與膽固醇發生競爭降低其吸收[51, 89]，但個

別蔬菜對血脂的影響機制仍缺乏足夠的文獻。

四、血液中尿酸的變化

尿酸為普林(purine)的最終產物，食物中主要的來源為蛋白質，當血液中的尿酸值大於 7.0 mg/dL，即稱為高尿酸血症。過去的研究指出蔬菜中的植物性蛋白質能夠加速尿液中尿酸的排出[90]，使血液中尿酸下降。而本次研究的結果中，尿酸在午餐前後並看到沒有明顯的趨勢，而是由空腹時間尿液開始，隨著時間一直往下降，可能是受到早餐所提供的低脂牛奶所影響。已有研究顯示牛奶中的蛋白質能夠使血液中尿酸快速的降低，在攝取 3 小時後達到顯著差異[91, 92]。因此可能使得本次研究欲探討蔬菜對於尿酸的影響被遮蔽。

五、尿液中礦物質排除量

結果顯示菠菜在尿液中鉀/肌酐酸(K/Cr)比值明顯較對照組高，可能源自其本身所含的鉀。每 100g (精)生重菠菜能夠提供 499.85mg 的鉀，約為其他試驗蔬菜的 1.5~2.7 倍(表 4-1)。然而菠菜與芹菜皆含有較高量的鈣，但在結果僅芹菜組與對照組相較，其尿液中所排出的鈣顯著較高。可能的原因是菠菜中含有較高量的草酸(oxalic acid)，會與二價陽離子例如鈣離子、鎂離子螯合形成草酸鈣及草酸鎂影響其吸收[93, 94]。

表 4-1 試驗蔬菜中鉀、鎂以及鈣的含量 (每 100g 精生重)

	菠菜	山苦瓜	芹菜	甜菜根	洋蔥
鉀 (mg)	499.85	205.12	313.73	293.65	180.00
鎂 (mg)	58.96	14.06	11.5	13.8	9.8
鈣 (mg)	82.71	19.4	83.2	14.4	21.1

第三節 各組挑選出候選代謝物與其相關文獻

一、菠菜

(一) m/z : 182.1287

資料庫中對應到的兩種物質其分子式皆為 $C_9H_{12}N_2O$ 。Fenuron 為苯脲型除草劑(phenylurea herbicide)為一個常見的除草劑，而 kynuramine 則為 melatonin 的代謝物。Melatonin(褪黑激素)過去已知為一內生性的代謝物，其作用與調節生理作息相關[95]。然而研究證實植物也含有 melatonin[96]，尤其在十字花科植物的種子含量較高，例如白芥菜(brassica hirta)及黑芥菜(brassica nigra)種子內的含量分別為 189 及 129 (ng/g)，而某些可食性蔬菜則含有較低的量(<0.6 ng/g)，例如小黃瓜、洋蔥、菠菜、胡蘿蔔、番茄等[97]，其在蔬菜內則為一種抗氧化劑[98]。

(二) m/z : 167.1068

資料庫中對應到的 perillic acid、myrtenic acid 以及 rotundifolone 這三種物質的分子式為 $C_{10}H_{14}O_2$ ，且皆為 terpenoids 的代謝物。目前已知 perillic acid 為紫蘇(*Perilla frutescens*) 所含的有效物質，具有抑制細胞癌化的功用[99]，且為柑橘類果皮中 limonene 最主要的代謝產物[100]。Perillic acid、myrtenic acid 皆參與 limonene and pinene degradation 的代謝途徑(圖 4-3)，myrtenic acid 則是 pinene 的下游代謝物。Rotundifolone 的主要來源為薄荷草，具有鎮痛功效[101]。由於這三種物質目前尚未有文獻指出存在於菠菜，因此仍需做進一步的標準品測定或是串連質譜儀(MS/MS)的分析。

二、山苦瓜

Coniferyl alcohol 為合成 lignin 及 tannin 的前驅物質以及 stilbene、coumarin 生成中間產物且與植物食材味道相關[102, 103]。可在苦味植物黃連(*coptis chinensis*) 當中被分離出來[104]。另一類候選物質則為糖酸類物質，與維生素 C 的代謝相關(圖 4-4)。本次試驗所攝取的蔬菜，其維生素 C 含量：菠菜約為 11.01(mg/100g 精生重)、

芹菜 6.59(mg/100g 精生重)、甜菜根 3.4(mg/100g 精生重)、洋蔥 5.59(mg/100g 精生重)，而苦瓜則約 45.3(mg/100g 精生重)，為其他蔬菜的 4~15 倍。因此這些物質有可能來自為維生素 C 代謝所得到的糖酸類物質，且這些物質皆在相關的代謝途徑上，因此研究測到的數值也可能是這些物質的總量而非單一物質。

三、芹菜

(一) m/z: 173.0971

候選代謝物 carvone 屬於 terpenoids，為一種具有香味的揮發性物質，廣泛存在於傘形科植物(Apiaceae)當中，例如香芹籽(caraway)[105]、蒔蘿(dill)等其他香草植物[106]以及薄荷(mentha spicata)[107]，文獻指出具有抗氧化[108]及抗發炎的效用[109]。

(二) m/z:191.10

候選代謝物 geranic acid 與 carvone 性質類似，同樣為 terpenoids，且具有揮發性香味，主要存在於檸檬草(lemongrass)當中[110]。

顯示這兩種挑到的物質可能為形成芹菜其獨特味道的物質來源。

四、甜菜根

Betalains 是甜菜根當中主要的成份，其中最具有代表性的為甜菜紅素(betanin)及仙人掌黃素(vulgaxanthin)。研究挑選到的候選代謝物 betalamic acid 可由甜菜紅素 betanin 直接斷裂得到[111]，為合成所有 betalains 的關鍵中間產物。Betalains 早期用途為食用色素及染劑[112]，近年來因研究發現其具有抗氧化[113, 114]、抗發炎，護肝及抗腫瘤[115]等特性，保健價值因而大大提升。Frank 等人[116]的研究提供 6 位健康受試者 500mL 甜菜汁(內含 362.7mg Betalains)後，以藥物動力學(pharmacokinetics)的方式探討尿液中 betalains 的排出狀況，結果顯示達到最大排出時間為 3 小時(Range : 2.5-8 小時)，與本次研究所看到的結果符合。

五、洋蔥

青蔥、洋蔥、大蒜等蔥屬植物，其強烈辛辣刺激的味道來自於本身所含的揮發性硫化物及硫酸鹽類(thiosulfinates)，例如 alliin (S-allyl cysteine sulphoxide)。動物實驗證實 alliin 能夠抑制致癌物與 DNA 的結合，降低癌症的發生[117]，且 alliin 也具有抗氧化的功效[118]。研究找到的候選代謝物 2-aminoacrylate 為 alliin 經由 alliin lyase 作用產生，是 alliin 的主要代謝物之一。而在 positive mode 之下雖然沒有找到 alliin 的 peak，但在 negative mode 則挑的一個可能性極高的 peak，但此 peak 是 alliin、isoalliin 抑或是兩者以固定的比例存在，則仍須更多的分析。



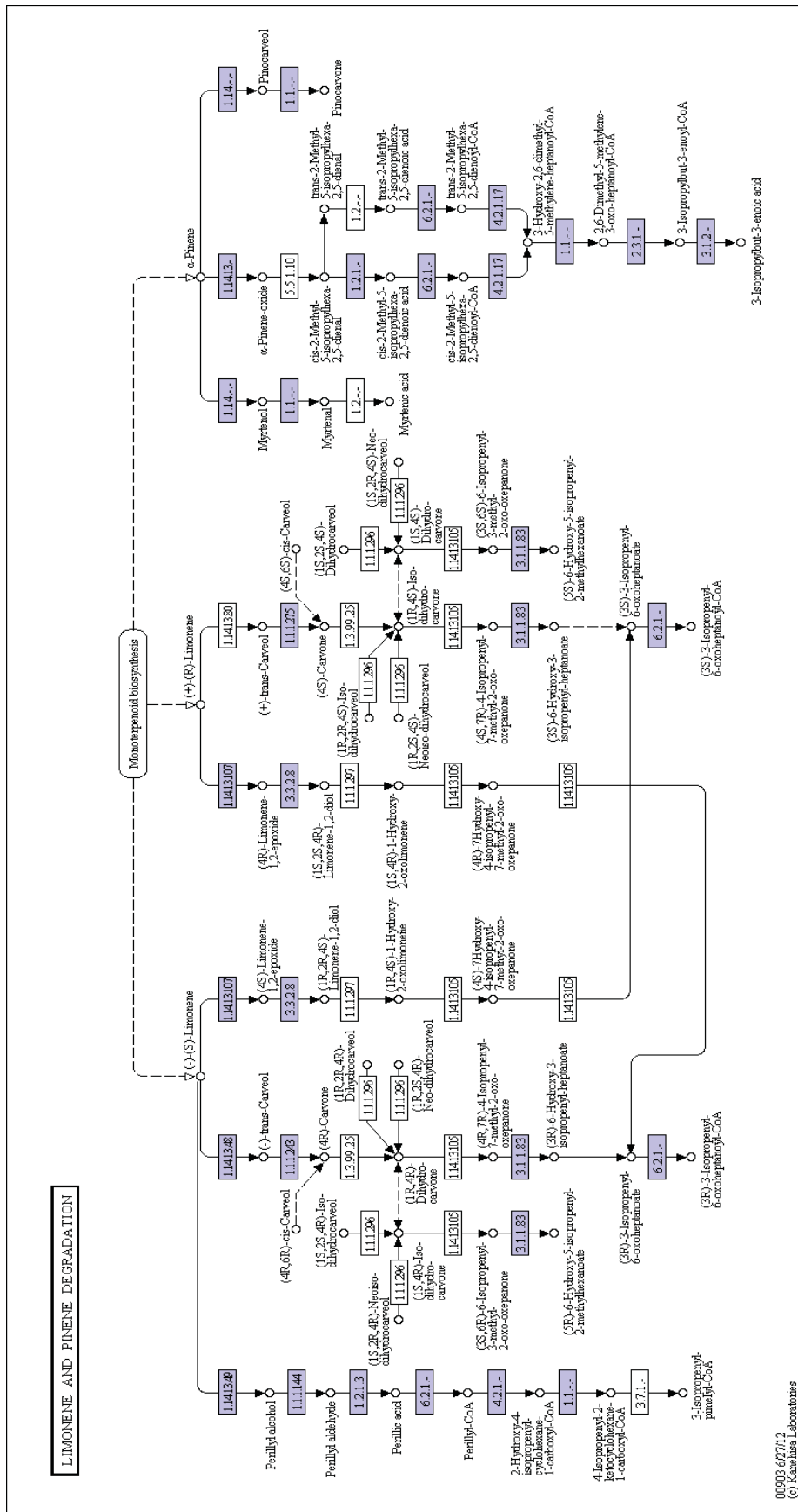


圖 4-3 Limonene and pinene degradation pathway
(圖片來源: KEGG web <http://www.genome.jp/kegg/>)

第四節 研究限制

一、混合檢體(pooling sample)的分析方式

本研究使用混合檢體方式分析，期望降低樣本數以減少分析時間，降低儀器分析上可能產生變異，且能夠使濃度低的小分子更容易被偵測。但缺點是由於樣本數的降低，在統計上的方式會受到侷限，且檢體合併後無法得知個體間或個體本身的代謝變化型態。

二、資料庫的侷限

目前代謝體分析的相關資料庫，對於植物的二級代謝物或經過人體消化吸收的型態相關資料仍然缺乏，且本次研究僅以一次 MS 的資料做為判定，可參考的資訊受限，因此研究的結果皆需再利用標準品或是其他分析資料確認。

三、LC-MS 的條件

本次研究為 non-targeted 的研究，在一開始的條件設定上，為一個較快速達到分離效果的設計。由於 LC 僅分析 6 分鐘，使得某一些時段的物質無法完全被分離，增加了鑑定的困難度。可以由此次試驗所找到的結果再進行適當的調整。

第五章 結論與未來方向

本研究以一個短期的蔬菜餵食研究探討不同蔬菜對人體的影響，在血液生化值的部分，可看到這些生化值在代謝過程當中，隨著時間的變化。並且給予一餐 200g 的蔬菜與對照組相較，可在血壓、血糖以及血脂的影響達到顯著差異。

代謝體研究的部分，為一個非標靶型分析 (non-targeted analysis) 的研究設計，透過較快速的 UPLC/QTOF-MS 分析方式，我們確實能夠挑選出在各種蔬菜當中具有特殊性的物質，當作這些蔬菜的攝取指標，但仍需要方法將這些物質分類或進行鑑定，以進一步找到與生理活性相關的代謝途徑或是將這些屬於蔬菜的代謝物與內生性代謝物的改變進行連結，才能再做更進一步的推論。



參考文獻

1. Liu RH: Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003, 78(3):517s-520s.
2. Johnson IT: Phytochemicals and cancer. *Proc Nutr Soc* 2007, 66(2):207-215.
3. Arts IC, Hollman PC: Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005, 81(1 Suppl):317S-325S.
4. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD: Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 2007, 26(1):51-78.
5. Fiehn O: Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 2002, 48(1-2):155-171.
6. Van Duyn MAS, Pivonka E: Overview of the Health Benefits of Fruit and Vegetable Consumption for the Dietetics Professional. *Journal of the American Dietetic Association* 2000, 100(12):1511-1521.
7. Glade MJ: Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition* 1999, 15(6):523-526.
8. van't Veer P, Jansen MC, Klerk M, Kok FJ: Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr* 2000, 3(1):103-107.
9. Lau FC, Shukitt-Hale B, Joseph JA: The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiol Aging* 2005, 26 Suppl 1:128-132.
10. Van Duyn MA, Pivonka E: Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. *J Am Diet Assoc* 2000, 100(12):1511-1521.
11. Groff JL, 黃士, Gropper SAS: 營養生化學. 新加坡: 新加坡商亞洲湯姆生國際公司; 2003.
12. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Sacks F, Stampfer MJ: A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men. *Circulation* 1992, 86(5):1475-1484.
13. Marlett JA, McBurney MI, Slavin JL: Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc* 2002, 102(7):993-1000.
14. Hamer M, Chida Y: Intake of fruit, vegetables, and antioxidants and risk of

- type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Journal of Hypertension* 2007, 25(12):2361-2369.
15. Walda IC, Tabak C, Smit HA, Rasanen L, Fidanza F, Menotti A, Nissinen A, Feskens EJ, Kromhout D: Diet and 20-year chronic obstructive pulmonary disease mortality in middle-aged men from three European countries. *Eur J Clin Nutr* 2002, 56(7):638-643.
 16. Pattison DJ, Symmons DP, Young A: Does diet have a role in the aetiology of rheumatoid arthritis? *Proc Nutr Soc* 2004, 63(1):137-143.
 17. Christen WG, Liu S, Schaumberg DA, Buring JE: Fruit and vegetable intake and the risk of cataract in women. *Am J Clin Nutr* 2005, 81(6):1417-1422.
 18. Cao GH, Sofic E, Prior RL: Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44(11):3426-3431.
 19. Bellik Y, Hammoudi SM, Abdellah F, Iguer-Ouada M, Boukraa L: Phytochemicals to prevent inflammation and allergy. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2012, 6(2):147-158.
 20. Shehzad A, Ha T, Subhan F, Lee YS: New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases. *Eur J Nutr* 2011, 50(3):151-161.
 21. Seymour EM, Singer AA, Bennink MR, Parikh RV, Kirakosyan A, Kaufman PB, Bolling SF: Chronic intake of a phytochemical-enriched diet reduces cardiac fibrosis and diastolic dysfunction caused by prolonged salt-sensitive hypertension. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008, 63(10):1034-1042.
 22. Liu RH: Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 2004, 134(12 Suppl):3479S-3485S.
 23. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H: Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet: Wiley-Blackwell; 2006.
 24. Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R: Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* 2003, 78(8):965-978.
 25. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L: Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011, 50(3):586-621.
 26. de Souza JJ, Vieira IJ, Rodrigues-Filho E, Braz-Filho R: Terpenoids from endophytic fungi. *Molecules* 2011, 16(12):10604-10618.
 27. Graßmann J: Terpenoids as Plant Antioxidants. In: *Vitamins &*

- Hormones*. Edited by Gerald L, vol. Volume 72: Academic Press; 2005: 505-535.
28. Kuttan G, Pratheeshkumar P, Manu KA, Kuttan R: Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. *Pharm Biol* 2011, 49(10):995-1007.
 29. Tan MJ, Ye JM, Turner N, Hohnen-Behrens C, Ke CQ, Tang CP, Chen T, Weiss HC, Gesing ER, Rowland A *et al*: Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chem Biol* 2008, 15(3):263-273.
 30. Leung L, Birtwhistle R, Kotecha J, Hannah S, Cuthbertson S: Anti-diabetic and hypoglycaemic effects of *Momordica charantia* (bitter melon): a mini review. *Br J Nutr* 2009, 102(12):1703-1708.
 31. Liener IE: Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Am J Clin Nutr* 1962, 1:281-298.
 32. Ariga T, Seki T: Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. *Biofactors* 2006, 26(2):93-103.
 33. Jones MG, Hughes J, Tregova A, Milne J, Tomsett AB, Collin HA: Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *J Exp Bot* 2004, 55(404):1903-1918.
 34. Latte KP, Appel KE, Lampen A: Health benefits and possible risks of broccoli - An overview. *Food and Chemical Toxicology* 2011, 49(12):3287-3309.
 35. Kopsell DA, Lefsrud MG: Spinach cultigen variation for tissue carotenoid concentrations influences human serum carotenoid levels and macular pigment optical density following a 12-week dietary intervention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54(21):7998-8005.
 36. Grover JK, Yadav SP: Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol* 2004, 93(1):123-132.
 37. Khanna P, Jain SC, Panagariya A, Dixit VP: Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. *J Nat Prod* 1981, 44(6):648-655.
 38. Kimura Y, Akihisa T, Yuasa N, Ukiya M, Suzuki T, Toriyama M, Motohashi S, Tokuda H: Cucurbitane-type triterpenoids from the fruit of *Momordica charantia*. *J Nat Prod* 2005, 68(5):807-809.
 39. Chang CI, Chen CR, Liao YW, Cheng HL, Chen YC, Chou CH: Cucurbitane-type triterpenoids from *Momordica charantia*. *J Nat Prod* 2006, 69(8):1168-1171.
 40. Akihisa T, Higo N, Tokuda H, Ukiya M, Akazawa H, Tochigi Y, Kimura Y, Suzuki T, Nishino H: Cucurbitane-type triterpenoids from the fruits of

- Momordica charantia and their cancer chemopreventive effects. *J Nat Prod* 2007, 70(8):1233-1239.
41. Chang CI, Chen CR, Liao YW, Cheng HL, Chen YC, Chou CH: Cucurbitane-type triterpenoids from the stems of momordica charantia. *J Nat Prod* 2008, 71(8):1327-1330.
 42. Winter M, Herrmann K: Esters and Glucosides of Hydroxycinnamic Acids in Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1986, 34(4):616-620.
 43. Kujala TS, Loponen JM, Klika KD, Pihlaja K: Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J Agric Food Chem* 2000, 48(11):5338-5342.
 44. Kujala T, Loponen J, Pihlaja K: Betalains and phenolics in red beetroot (*Beta vulgaris*) peel extracts: extraction and characterisation. *Z Naturforsch C* 2001, 56(5-6):343-348.
 45. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, Rashid R, Miall P, Deanfield J, Benjamin N *et al*: Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension* 2008, 51(3):784-790.
 46. Rosa LAdl, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA: Fruit and vegetable phytochemicals : chemistry, nutritional value, and stability. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2010.
 47. Rose P, Widder S, Looft J, Pickenhagen W, Ong CN, Whiteman M: Inhibition of peroxynitrite-mediated cellular toxicity, tyrosine nitration, and alpha1-antiproteinase inactivation by 3-mercapto-2-methylpentan-1-ol, a novel compound isolated from *Allium cepa*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 302(2):397-402.
 48. Zhou K, Zhao F, Liu Z, Zhuang Y, Chen L, Qiu F: Triterpenoids and flavonoids from celery (*Apium graveolens*). *J Nat Prod* 2009, 72(9):1563-1567.
 49. Ko FN, Huang TF, Teng CM: Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1115(1):69-74.
 50. Qincai. In: Chang H.M. and But P.P.H. ed Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica(Vol I).1986 *Sigapore: World Scientific Publishing*:579-582.
 51. Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A: The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics.

- Mol Nutr Food Res* 2009, 53(10):1303-1315.
52. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F: Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998, 16(9):373-378.
 53. Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T: Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J Bacteriol* 1998, 180(19):5109-5116.
 54. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID: Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol* 2005, 3(5):431-438.
 55. Holmes E, Loo RL, Cloarec O, Coen M, Tang H, Maibaum E, Bruce S, Chan Q, Elliott P, Stamler J *et al*: Detection of urinary drug metabolite (xenometabolome) signatures in molecular epidemiology studies via statistical total correlation (NMR) spectroscopy. *Anal Chem* 2007, 79(7):2629-2640.
 56. Nicholson JK, Lindon JC: Systems biology - Metabonomics. *Nature* 2008, 455(7216):1054-1056.
 57. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E: 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999, 29(11):1181-1189.
 58. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, Beckonert O, Ebbels TM, Reilly MD, Robertson D *et al*: Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003, 187(3):137-146.
 59. Shockcor JP, Holmes E: Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis. *Curr Top Med Chem* 2002, 2(1):35-51.
 60. Nicholson JK, Lindon JC: Systems biology: Metabonomics. *Nature* 2008, 455(7216):1054-1056.
 61. Fiehn O: Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002, 48(1-2):155-171.
 62. Lu Y, A J, Wang G, Hao H, Huang Q, Yan B, Zha W, Gu S, Ren H, Zhang Y *et al*: Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabonomic approach to differentiating hypertension- and age-related metabolic variation in spontaneously hypertensive rats. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008, 22(18):2882-2888.
 63. Heinzmann SS, Brown IJ, Chan Q, Bictash M, Dumas ME, Kochhar S, Stamler J, Holmes E, Elliott P, Nicholson JK: Metabolic profiling strategy

- for discovery of nutritional biomarkers: proline betaine as a marker of citrus consumption. *American Journal of Clinical Nutrition* 2010, 92(2):436-443.
64. Watkins SM, Reifsnnyder PR, Pan HJ, German JB, Leiter EH: Lipid metabolome-wide effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone. *J Lipid Res* 2002, 43(11):1809-1817.
 65. Winnike JH, Busby MG, Watkins PB, O'Connell TM: Effects of a prolonged standardized diet on normalizing the human metabolome. *American Journal of Clinical Nutrition* 2009, 90(6):1496-1501.
 66. van den Berg RA, Hoefsloot HC, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ: Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 2006, 7:142.
 67. Brodsky L, Moussaieff A, Shahaf N, Aharoni A, Rogachev I: Evaluation of peak picking quality in LC-MS metabolomics data. *Anal Chem* 2010, 82(22):9177-9187.
 68. Walsh MC, Brennan L, Pujos-Guillot E, Sebedio JL, Scalbert A, Fagan A, Higgins DG, Gibney MJ: Influence of acute phytochemical intake on human urinary metabolomic profiles. *Am J Clin Nutr* 2007, 86(6):1687-1693.
 69. Guy PA, Tavazzi I, Bruce SJ, Ramadan Z, Kochhar S: Global metabolic profiling analysis on human urine by UPLC-TOFMS: issues and method validation in nutritional metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008, 871(2):253-260.
 70. Llorach R, Urpi-Sarda M, Jauregui O, Monagas M, Andres-Lacueva C: An LC-MS-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after cocoa consumption. *J Proteome Res* 2009, 8(11):5060-5068.
 71. Llorach R, Garrido I, Monagas M, Urpi-Sarda M, Tulipani S, Bartolome B, Andres-Lacueva C: Metabolomics study of human urinary metabolome modifications after intake of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skin polyphenols. *J Proteome Res* 2010, 9(11):5859-5867.
 72. Okuda S, Yamada T, Hamajima M, Itoh M, Katayama T, Bork P, Goto S, Kanehisa M: KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways. *Nucleic Acids Res* 2008, 36(Web Server issue):W423-426.
 73. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, Psychogios N, Dong E, Bouatra S *et al*: HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* 2009, 37(Database issue):D603-610.
 74. Afendi FM, Okada T, Yamazaki M, Hirai-Morita A, Nakamura Y, Nakamura K, Ikeda S, Takahashi H, Altaf-Ul-Amin M, Darusman LK *et al*:

- KNapSack family databases: integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol* 2012, 53(2):e1.**
75. **Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, Berruex F, Fuerholz A, Fay LB: Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics. *Anal Biochem* 2006, 352(2):274-281.**
76. **Slupsky CM, Rankin KN, Wagner J, Fu H, Chang D, Weljie AM, Saude EJ, Lix B, Adamko DJ, Shah S *et al*: Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Anal Chem* 2007, 79(18):6995-7004.**
77. **Gibney MJ, Walsh M, Brennan L, Roche HM, German B, van Ommen B: Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *Am J Clin Nutr* 2005, 82(3):497-503.**
78. **Stella C, Beckwith-Hall B, Cloarec O, Holmes E, Lindon JC, Powell J, van der Ouderaa F, Bingham S, Cross AJ, Nicholson JK: Susceptibility of human metabolic phenotypes to dietary modulation. *J Proteome Res* 2006, 5(10):2780-2788.**
79. **Walsh MC, Brennan L, Malthouse JP, Roche HM, Gibney MJ: Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2006, 84(3):531-539.**
80. **Favé G, Beckmann M, Lloyd AJ, Zhou S, Harold G, Lin W, Tailliant K, Xie L, Draper J, Mathers JC: Development and validation of a standardized protocol to monitor human dietary exposure by metabolite fingerprinting of urine samples. *Metabolomics* 2011.**
81. **Brouns F, Bjorck I, Frayn KN, Gibbs AL, Lang V, Slama G, Wolever TM: Glycaemic index methodology. *Nutr Res Rev* 2005, 18(1):145-171.**
82. **Allison DB, Paultre F, Maggio C, Mezzitis N, Pi-Sunyer FX: The use of areas under curves in diabetes research. *Diabetes Care* 1995, 18(2):245-250.**
83. **Potteiger JA, Jacobsen DJ, Donnelly JE: A comparison of methods for analyzing glucose and insulin areas under the curve following nine months of exercise in overweight adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002, 26(1):87-89.**
84. **Cardoso FC, Sears W, LeBlanc SJ, Drackley JK: Technical note: comparison of 3 methods for analyzing areas under the curve for glucose and nonesterified fatty acids concentrations following epinephrine challenge in dairy cows. *J Dairy Sci* 2011, 94(12):6111-6115.**
85. **Kapil V, Milsom AB, Okorie M, Maleki-Toyserkani S, Akram F, Rehman F,**

- Arghandawi S, Pearl V, Benjamin N, Loukogeorgakis S *et al*: Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension* 2010, 56(2):274-281.
86. Sakai Y, Murakami T, Yamamoto Y: Antihypertensive effects of onion on NO synthase inhibitor-induced hypertensive rats and spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotech Bioch* 2003, 67(6):1305-1311.
87. Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T: Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr* 2007, 137(11):2405-2411.
88. Glore SR, Van Treeck D, Knehans AW, Guild M: Soluble fiber and serum lipids: a literature review. *J Am Diet Assoc* 1994, 94(4):425-436.
89. Wang GD, Wang Z, Han JH, He M, Yang YX: [Effects of phytosterol ester on serum lipid level in rats]. *Wei Sheng Yan Jiu* 2006, 35(5):581-583.
90. Brockis JG, Levitt AJ, Cruthers SM: The effects of vegetable and animal protein diets on calcium, urate and oxalate excretion. *Br J Urol* 1982, 54(6):590-593.
91. Garrel DR, Verdy M, PetitClerc C, Martin C, Brule D, Hamet P: Milk- and soy-protein ingestion: acute effect on serum uric acid concentration. *Am J Clin Nutr* 1991, 53(3):665-669.
92. Navder KP, Fryer EB, Fryer HC: Effects of skim milk, skim milk yogurt, orotic acid, and uric acid on lipid metabolism in rats. *J Nutr Biochem* 1990, 1(12):640-646.
93. Kikunaga S, Arimori M, Takahashi M: The bioavailability of calcium in spinach and calcium-oxalate to calcium-deficient rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1988, 34(2):195-207.
94. Berg W, Bothor C, Pirlich W, Janitzky V: Influence of magnesium on the absorption and excretion of calcium and oxalate ions. *Eur Urol* 1986, 12(4):274-282.
95. Perreau-Lenz S, Pevet P, Buijs RM, Kalsbeek A: The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol Int* 2004, 21(1):1-25.
96. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Simopoulos AP, Maldonado MD, Flores LJ, Terron MP: Melatonin in edible plants (phytomelatonin): Identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev Nutr Diet* 2007, 97:211-230.
97. Iriti M, Faoro F: Grape phytochemicals: a bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Med Hypotheses* 2006, 67(4):833-838.
98. Reiter RJ, Tan DX: Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 957:341-344.

99. **Duelund L, Amiot A, Fillon A, Mouritsen OG: Influence of the active compounds of *Perilla frutescens* leaves on lipid membranes. *J Nat Prod* 2012, 75(2):160-166.**
100. **Chow HH, Salazar D, Hakim IA: Pharmacokinetics of perillic acid in humans after a single dose administration of a citrus preparation rich in d-limonene content. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, 11(11):1472-1476.**
101. **de Sousa DP, Junior EV, Oliveira FS, de Almeida RN, Nunes XP, Barbosa-Filho JM: Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: structure-activity relationship. *Z Naturforsch C* 2007, 62(1-2):39-42.**
102. **Iiyama K, Lam TBT, Stone BA: Covalent Cross-Links in the Cell-Wall. *Plant Physiology* 1994, 104(2):315-320.**
103. **Koeduka T, Fridman E, Gang DR, Vassao DG, Jackson BL, Kish CM, Orlova I, Spassova SM, Lewis NG, Noel JP *et al*: Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *P Natl Acad Sci USA* 2006, 103(26):10128-10133.**
104. **Chen L, Wang L, Zhang Q, Zhang S, Ye W: [Non-alkaloid chemical constituents from *Coptis chinensis*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2012, 37(9):1241-1244.**
105. **Matsumura T, Ishikawa T, Kitajima J: Water-soluble constituents of caraway: carvone derivatives and their glucosides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2002, 50(1):66-72.**
106. **de Carvalho CCCR, da Fonseca MMR: Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chem* 2006, 95(3):413-422.**
107. **Chauhan SS, Prakash O, Padalia RC, Vivekanand, Pant AK, Mathela CS: Chemical diversity in *Mentha spicata*: antioxidant and potato sprout inhibition activity of its essential oils. *Nat Prod Commun* 2011, 6(9):1373-1378.**
108. **Bicas JL, Neri-Numa IA, Ruiz AL, De Carvalho JE, Pastore GM: Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food Chem Toxicol* 2011, 49(7):1610-1615.**
109. **de Sousa DP, Camargo EA, Oliveira FS, de Almeida RN: Anti-inflammatory activity of hydroxydihydrocarvone. *Z Naturforsch C* 2010, 65(9-10):543-550.**
110. **Masuda T, Odaka Y, Ogawa N, Nakamoto K, Kuninaga H: Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *J***

- Agric Food Chem* 2008, 56(2):597-601.
111. Kimler L, Larson RA, Messenge.L, Moore JB, Mabry TJ: Betalamic Acid, a New Naturally Occurring Pigment. *J Chem Soc Chem Comm* 1971(21):1329-&.
 112. Jimenez-Aparicio A, Gutierrez-Lopez G: Production of food related colorants by culture of plant cells. The case of betalains. *Adv Exp Med Biol* 1999, 464:195-210.
 113. Kanner J, Harel S, Granit R: Betalains--a new class of dietary cationized antioxidants. *J Agric Food Chem* 2001, 49(11):5178-5185.
 114. Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Livrea MA: Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *Am J Clin Nutr* 2004, 80(4):941-945.
 115. Lu X, Wang Y, Zhang Z: Radioprotective activity of betalains from red beets in mice exposed to gamma irradiation. *Eur J Pharmacol* 2009, 615(1-3):223-227.
 116. Frank T, Stintzing FC, Carle R, Bitsch I, Quaas D, Strass G, Bitsch R, Netzel M: Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharmacol Res* 2005, 52(4):290-297.
 117. Singh V, Belloir C, Siess MH, Le Bon AM: Inhibition of carcinogen-induced DNA damage in rat liver and colon by garlic powders with varying alliin content. *Nutr Cancer* 2006, 55(2):178-184.
 118. Chung LY: The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J Med Food* 2006, 9(2):205-213.



附錄

附錄一 受試者同意書

國防醫學院三軍總醫院人體試驗受試者同意書

我們邀請您參加本人體試驗，此份同意書提供您本研究相關資訊，研究主持人或研究護士將為您詳細說明並回答任何問題。

計畫名稱：「以代謝體研究法探討植物性食物代謝體與高血壓代謝體之關聯：搜尋關鍵性血壓調控代謝物/代謝體，並探討蔬菜代謝體與血壓調控代謝物（體）及發炎指標的關係」之實驗二：建立蔬菜之人體代謝指紋資料庫

執行單位：三軍總醫院	電話：02-87923311#10083
計畫主持人：賴鴻政	職稱：產科主任/副教授
計畫共同主持人：潘文涵	職稱：研究員
協同主持人：徐麗芬	職稱：研究員
協同主持人：許聞廉	職稱：特聘研究員
協同主持人：楊欣洲	職稱：助研究員

一、計畫簡述

1. 研究計畫目的：針對蔬菜進行給食研究，探討其對人體血液代謝體、尿液代謝體以及血壓的影響。
2. 研究預訂在何地執行：研究預定在三軍總醫院的臨床研究中心執行。
3. 預期研究／試驗之期限：2010 年 12 月至 2013 年 12 月

二、試驗目的

依據行政院衛生署 98 年的主要死亡原因統計結果，發現十大死因大多為慢性疾病。慢性疾病，包括癌症、糖尿病、心血管疾病、高血壓、高血膽固醇等與飲食型態有密切的關係，尤其是大量蔬菜、水果的飲食型態在許多流行病學以及飲食試驗研究中被發現和降低慢性病發生有關。

因此，本研究希望可以比較人體內所有的代謝物以及血壓在攝取蔬菜前和攝取後有什麼改變，了解發生改變的代謝物種類和改變的程度可以進一步去發展這些蔬菜的降血壓以及改變代謝異常的潛能。本研究將會提供已經有文獻指出可能具降血

壓效果的蔬菜，例如：苦瓜、洋蔥、芹菜、菠菜以及甜菜根等一般可食性蔬菜。

三、試驗對象之條件

a、納入條件：

- (1) 18-60歲
- (2) BMI：介於18.5-30之間 (kg/m²)
- (3) 無抽菸、酗酒等不良嗜好者

b、排除條件：

- (1) 有服用高血壓、糖尿病藥物或罹患免疫性疾病（過敏性疾病、自體免疫疾病等）、肝臟疾病、代謝性疾病（甲狀腺亢進或低下等）等不適於參加此飲食試驗者及其他重大疾病的人，如癌症
- (2) 不願停掉經過評估後認為會影響實驗結果的膳食補充劑者
- (3) 無法配合食用本研究提供的膳食者
- (4) 試驗進行前三個月內有發生泌尿道感染或使用抗生素者

★本院規定國防醫學院學生不得參加臨床（人體）試驗。

四、試驗方法、程序及相關檢驗

1.關於實驗供餐

我們將會提供您連續兩天的三餐飲食，第一天的餐點將會以宅配的方式送到您的家中，而第二天的餐點，則需要您至我們合作的醫院用餐，這將會佔去您這一整天的時間。我們設計餐點的原則是依據行政院衛生署公佈的國人膳食營養素參考攝取量（DRIs）進行設計，可以提供您的足夠的熱量及營養素。

因為實驗的需要，因此在第一天的三餐飲食以及第二天的早餐是不含任何蔬菜水果的餐點，只有在第二天的午餐會提供您含有蔬菜的餐點。由於不同的蔬菜造成的影響可能不一樣，因此我們希望每一次試驗之後能夠有五天的休息期，也就是說您一個禮拜只有兩天需要接受我們提供的餐食，但在這兩天內您只能食用我們提供的餐點。（包括禁止飲酒或食用任何膳食補充劑；飲料除白開水外，一律禁止。）

本研究希望能比較不同的蔬菜的代謝狀況，以一個禮拜進行一種蔬菜試驗的方式，因此您需要完成5種蔬菜與對照組試驗，才算完成整個實驗的流程。

表一、供餐類型

	第一天	第二天
早餐	不含蔬菜、水果	同前一天
午餐	不含蔬菜、水果	含蔬菜午餐
晚餐	不含蔬菜、水果	一般晚餐

2.關於分析項目

a.血液和尿液中代謝物

本研究在每次試驗的第二天，需要採集您的血液以及收集尿液進行分析。將會由專業護士為您裝上採血裝置，這個裝置可以避免每一次採血時的重覆扎針。

表二、分析檢體項目及方法

五、可能產生之副作用、危險、不適、發生率及處理方法

1. 研究中之抽血行為與一般醫療檢驗程序相同，雖在研究過程中可能遇到之風險微乎其微，但均已作好妥善規劃。抽血過程中，將使用拋棄式針頭與針筒，並遵守無菌原則；除下針處的肌膚疼痛外，流血失控或抽血局部受到感染之機率相當微

項目	方式
血液	空腹(早餐前)、午餐前各採集一次以及午餐後每 1 小時採集一次，每次 5 c.c，到晚餐前結束。
尿液	空腹(醒來後第一次)、午餐前各收集一次以及午餐後每 2 小時收集一次，每次收集當次全部的尿液，到晚餐前結束。
血壓	空腹(早餐前)、午餐前以及午餐後每間隔一小時進行測量，到晚餐前結束。

小。

2. 風險發生處理方式：本計畫會額外編列經費購買責任保險，若因計畫執行引起試驗相關損害時，您將會獲得合理的醫療支出給付。

六、其他可能之治療方式及說明(註明：不適用)

不適用

七、試驗預期效益

本研究在國內外皆屬於一個領先性的實驗，因此無法預期研究效果及能夠帶來的利益。了解這些發生改變的代謝物種類和改變的程度，或許能幫助研究者找出的蔬菜內有益處的物質及作用機制。

八、試驗進行中受試者之禁忌、限制與應配合之事項

在飲食介入的兩天中，除了研究給予的飲食外，您不可擅自攝取其他的飲食，若您有食用其他食物需詳細記錄於發放的飲食日誌中。

九、受試者權益

(一)經費負擔

參與本計畫進行期間，試驗餐食及相關花費全由本研究供應，您不需支付任何費用。

(二)參加試驗之補助

研究編列預算以支付受試者工作補償金與交通費，以受試者至合作醫院的天數計算，每天 1500 元。

(三)損害補償

- 如依本研究所訂臨床試驗計畫，因發生不良反應造成損害，由【三軍總醫院及國家衛生研究院】負損害補償責任。但本受試者同意書上所記載之可預期不良反應，不予補償。
- 如依本研究所訂臨床試驗計畫，因而發生不良反應或損害，三軍總醫院願意提供專業醫療照顧及醫療諮詢。您不必負擔治療不良反應或損害之必要醫療費用。
- 除前二項補償及醫療照顧外，本研究不提供其他形式之補償。若您不願意接受這樣的風險，請勿參加試驗。
- 您不會因為簽署本同意書，而喪失在法律上的任何權利。
- 本研究有投保責任保險。(本研究會額外編列經費購買責任保險，若因計畫執行引起試驗相關損害時，您將會獲得合理的醫療支出給付。)

(四)保護隱私

試驗所得資料可能發表於學術雜誌，但不會公佈您的姓名，同時計畫主持人將謹慎維護您的隱私權，如果發表試驗結果，受試者之身份仍將保密。衛生署主管機關、試驗委託者與本院人體試驗審議委員會在不危害您的隱私情況下，依法有權檢視您的資料。

(五) 試驗過程中如有新資訊可能影響您繼續參與臨床試驗的意願的任何重大發現，都將即時提供給您。

(六) 若您對研究有疑問時，您可以和計畫主持人聯絡，計畫主持人 賴鴻政，電話：(02)87923311#10083 手機：02-87923311#13826；對個人權益有疑慮，可和本院人體試驗審議委員會聯絡，電話：02-8792-3311 分機 10552、專線：02-2793-6995、傳真：02-2793-6049、E-mail：tsghirb@mail.ndmctsgh.edu.tw 或郵寄地址：11490 台北市內湖區成功路二段 325 號三軍總醫院醫療大樓 5113 室醫學研究部人體試驗審議委員會收。

十、試驗之退出與中止

您可自由決定是否參加本試驗。試驗過程中，您不須任何理由，可隨時撤銷同意，退出試驗，且不會引起任何不愉快或影響日後的醫療照顧。此外，您已充份了解必要時，試驗主持人或臨床試驗委託者亦可能中止該試驗之進行。

十一、結束或中途退出研究，剩餘檢體處理方法

願意繼續提供國家衛生研究院從事其他基因及發炎性指標方面研究，屆時再徵求您的同意。

由國家衛生研究院群體健康科學研究所/潘文涵實驗室代為銷毀

十二、簽章

(一) 取得同意書人(本計畫中擔任之職稱：_____)

本人已詳細解釋本計畫中上述研究方法的性質與目的，及可能產生的危險與利益，

並已回答受試者之疑問。

取得同意書人簽名：

年 月 日

(二) 受試者

經由說明後本人已詳細瞭解上述研究方法及可能產生的危險與利益，有關本試驗計畫的疑問，亦獲得詳細解釋。本人同意並自願參與本研究，且將持有同意書副本。

受試者簽名：

年 月 日

身份證字號：

聯絡電話：

通訊地址：

受試者未滿 20 歲，需受試者本人與法定代理人共同簽名。

法定代理人簽名：

年 月 日

身份證字號：

聯絡電話：

通訊地址：

(三) 計畫主持人簽名：

年 月 日



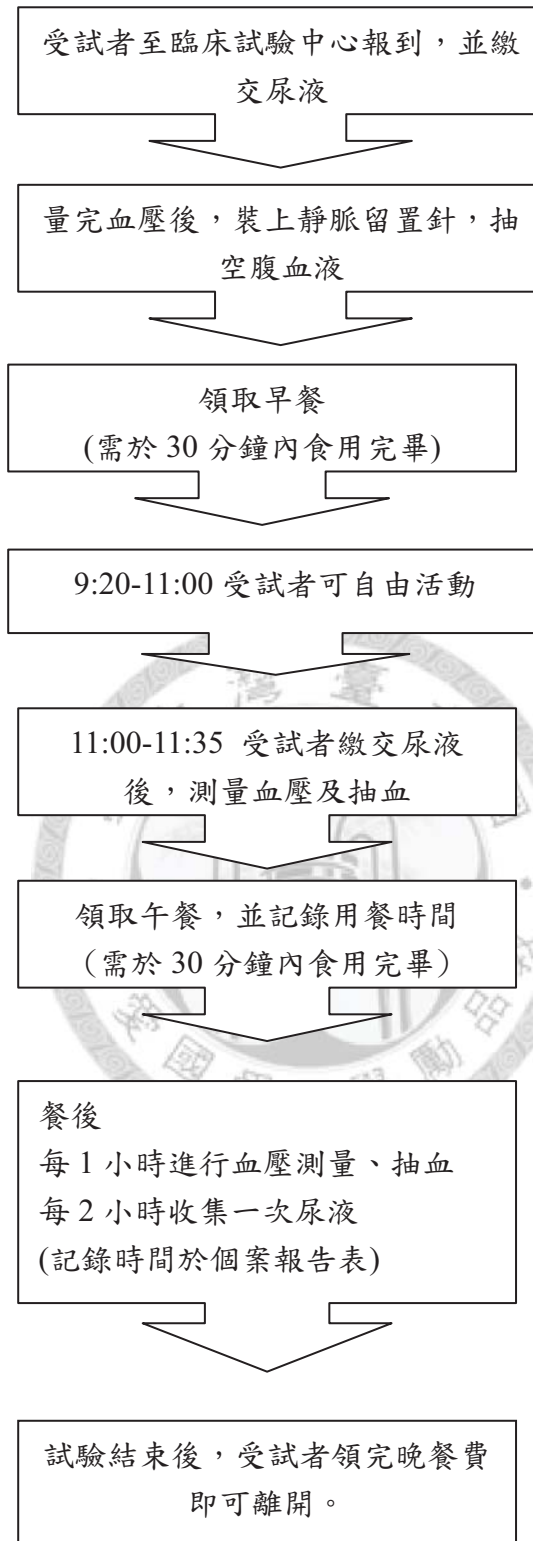
附錄二 試驗操作手冊

試驗操作手冊

目錄

一、試驗流程.....	85
二、血壓測量.....	87
1.測量前注意事項.....	87
2.放置壓脈帶.....	87
3.測量程序及次數.....	87
三、血液採集.....	88
1.測量前注意事項.....	88
2.採血前後注意事項.....	89
3.對個案之準備.....	89
4.採血用具之使用及注意事項.....	90
5.採血步驟.....	90
6.採血後之處理.....	91
四、尿液收集.....	92
1.早上空腹尿液.....	92
2.其他時間點尿液.....	92
五.檢體處理.....	93
1. 血液.....	93
2 尿液.....	93

一、試驗流程



S: serum U: urine BP: blood pressure

時間	事項	備註
08:00	w75 報到	
08:00-08:15	受試者繳交前一晚尿液(U1) 後，至病房內靜坐至少 5 分鐘。	尿液放置冰上或 4°C 冰箱，避光。
08:15-08:47	開始幫受試者測量血壓 (BP1)、抽空腹血(S1)	紅頭管放置室溫，30 分鐘後離心。 記錄時間。
08:30-08:50	發放早餐(用餐時間 30 分鐘)	
09:20-11:00	受試者可自由活動	
11:00-11:35	收集餐前尿液(U2)	尿液放置冰上或 4°C 冰箱，避光。
11:20-11:52	測量血壓(BP2) 抽取餐前血液(S2)	紅頭管放置室溫，30 分鐘後離心。 記錄時間
11:35-11:55	發放午餐(用餐時間 30 分鐘)	
13:00-13:32	測量血壓(BP3) 收集餐後 1 小時血液(S3)	紅頭管放置室溫，30 分鐘後離心。 記錄時間
12:05-14:15	收集餐後 2 小時尿液(U3)	尿液放置冰上或 4°C 冰箱，避光。
14:00-14:32	測量血壓(BP4) 收集餐後 2 小時血液(S4)	紅頭管放置室溫 30 分鐘。 記錄時間。
15:00-15:32	測量血壓(BP5) 收集餐後 3 小時血液(S5)	紅頭管放置室溫 30 分鐘。 記錄時間。
14:00-16:15	收集餐後 4 小時尿液(U4)	尿液放置冰上或 4°C 冰箱，避光。
16:00-16:32	測量血壓(BP6) 收集餐後 4 小時血液(S6)	紅頭管放置室溫 30 分鐘。 記錄時間。
17:00-17:32	測量血壓(BP7) 收集餐後 5 小時血液(S7)	紅頭管放置室溫 30 分鐘。 記錄時間。
18:00-18:32	測量血壓(BP8) 收集餐後 6 小時血液(S8)	紅頭管放置室溫 30 分鐘。 記錄時間。
16:00-19:15	收集餐後 7 小時尿液(U5)	尿液放置冰上或 4°C 冰箱，避光。
19:00-19:32	測量血壓(BP9) 收集餐後 7 小時血液(S9)	紅頭管放置室溫 30 分鐘。 記錄時間。

二、血壓測量

1.測量前注意事項

- (1) 測量前請受試者先除去較厚的衣物（如毛衣或外套）。
- (2) 測量前提醒受試者勿隨意走動，維持坐臥姿。
- (3) 將血壓枕放在適當高度的桌面上。請受試者手臂平擺，右手手心朝上，手臂舒適平放。注意壓脈帶手的位置必需與心臟同高。
- (4) 請受試者雙腿不可交叉，右手不可握拳。
- (5) 提醒受試者測量的時候不要說話。
- (6) 若受試者尿漲或處在壓力狀態時不宜測量血壓。

2.放置壓脈帶

- (1) 受試者衣物處理以不會對血管造成束縛、不對測量造成阻礙為原則。
- (2) 測量者將壓脈帶上的 Φ 記號對準肱動脈上。
- (3) 將壓脈帶綁在上臂離手肘一英吋（2.54 公分）的位置。
- (4) 鬆緊度適中，壓脈帶不會滑落即可。

3.測量程序及次數

- (1) 按下按鈕進行血壓測量，記錄血壓計螢幕上顯示出的收縮壓（SBP），舒張壓（DBP），及脈搏數值。
- (2) 每位受測者均重複測量四次血壓，每次測量中間請受試者手臂輕舉，休息半分鐘再進行下一次測量。
- (3) 若第二次及第三次測量血壓值差異達 10mmHg 以上，則使用最接近的兩次測量值的平均數值。

三、血液採集

1.測量前注意事項

(1) 在採血前須將採血管貼上標籤（註明姓名、個案編號）

(2) 確認器材

器材清單：

品項	數量	備註
靜脈留置針 (20G IV. CATHETER)	70 支	
靜脈帽(lock)	70 個	
防水透氣敷料 (Tegaderm™/OP Site)	70 片	
3mL 注射針	600 支	注射生理食鹽水用
21G 真空採血針	700 支	
真空採血管(紅頭管)	1200 支	
酒精棉片	700 片	
乾棉球	70 個	
手套	2 盒	
500cc 生理食鹽水	6 瓶	
1 吋紙膠	5 捲	
止血帶	2 條	
小枕頭	2 個	
試管		裝廢棄的生理食鹽水

2.採血前後注意事項

(1)為預防血液傳染之疾病（如B型肝炎），所以在採血及血液處理過程中應帶上手套，本身皮膚之傷口要妥善處理。

* 如遭抽過血之針頭所刺：應立即將傷口的血擠出，用清水及肥皂水徹底洗潔，並將該針頭所屬之血清檢體送醫院檢驗，說明狀況，聽醫師的指示。

* 身體沾到血液檢體：應立即用清水及肥皂水徹底清潔，最好配合用酒精消毒。

(2)駐站內各種設備及環境之定期消毒，或受檢體污染時，可用0.1%次氯酸鈉，或用市售之漂白水，以20cc漂白水加2L清水混合使用。

(3)凡沾血之針頭和其它採血、血處理用具要分開處理，置於滅菌袋中，集中一起，待檢體運送人員到達時一併送回生醫所處理。

(4)為維護大家的健康起見，戴手套的手因可能沾到血液而不自知，所以應避免戴手套觸摸公用的物品如電話、電梯按鈕、門把、抽屜等。

(5)養成工作前後要洗手的好習慣。

3.對個案之準備

(1)一律採坐姿採血。

(2)詢問個案是否有禁食十二個小時以上（不包括喝開水）。若無禁食，應告知個案這會影響測量結果，宜另安排適當的時間補抽血。

(3)詢問個案有無出血或血液疾病之問題，若參與者曾有抽血後流血不止之情形，則應放棄採血。

(4)往往整個參與的過程中留給個案最深刻印象的地方是採血的部份，因此我們的態度十分重要，應讓他們覺得我們很有誠意。對較激動、神經質之研究對象，可以告知研究的目的是檢驗的項目以增加他們參與之意願；並讓個案感覺抽血並不是那麼痛苦。適時給予他們讚美或安慰以除去他的憂慮。

4.採血用具之使用及注意事項

(1).止血帶

止血帶可用以使靜脈血液聚集。使用方法是將止血帶綁在採血點上 7.5 至 10 cm 處。

請注意以下幾點：

*止血帶不可綁得過緊，避免個案感覺不舒服，同時可避免因止血帶過緊造成血流量不足。

*止血帶不宜綁超過 2 分鐘，除避免個案感覺不舒服外，也可避免因止血帶綁得過久而使得正常凝血因子數值受到影響。

*若使用止血帶來找出靜脈所在，則須先鬆綁並等 2 分鐘後再使用。

*若個案之皮膚對止血帶過敏，則可在要綁止血帶處先放上紗布，再綁上止血帶以避免直接之接觸。

(2).採血點之清潔

*酒精以濃度在 75% 之酒精其滅菌效果最佳。因酒精具揮發性，所以宜先將 75% 酒精適量倒入乾淨之罐中，再放入適量之棉球，不用時記得將蓋子蓋上。

*取出濕度適中之棉球，自中央而外在採血點上拭擦。

*讓採血點上之酒精揮發乾，以避免溶血及採血時個案有刺痛的感覺。

*若下針採血不易，而嘗試用手去找出靜脈，則應再次清潔採血點後才下針。

5.採血步驟

安置 iv. set

(1)以空針備好 3mL 乾淨的生理食鹽水。

(2)請個案握緊拳頭，綁上止血帶。將你的大姆指按在採血點下 2.5cm 至 5cm 處，拉緊他的皮膚並固定靜脈之位置。

(3)將靜脈留置針斜面朝上，以約 15 度之角度平穩的推進靜脈，當針頭進入血管後立即水平推進，以不刺穿血管為原則。此時若針頭有進入血管，會有回血的現象。

用紙膠將針頭固定在採血點上，並將 lock 鎖上後，以防水透氣敷料封好可避免傷口

感染。

(4) 確定個案之手臂仍是平的或朝下的，以真空採血針取空腹血至採血管後，將剛剛備好的生理食鹽水注入，避免產生凝血。

(5)完成 iv. set 後，觀察個案的反應。

iv. set 安置後的採血

(1)以空針備好 3mL 乾淨的生理食鹽水。

(2)真空採血針從 lock 採血，先以試管盛裝剛剛注入在 lock 裡的生理食鹽水後，再換上真空採血管，收集血液。

(3) 將步驟(1)備好的生理食鹽水注入，避免產生凝血。

(4) 之後的每一次採血即重複上述(1)-(3)步驟。

6.採血後之處理

(1)注意事項

*放一塊乾淨之棉球於採血點上，抽出針頭，透過棉球略施壓力於採血點上。也可用紙繃帶連同棉球貼在傷口上。正常情況下，3 分鐘內便會停止出血。

*用過之針頭必須套上蓋子，放進滅菌袋，集中送回生醫所處理。

*若個案出血不止，可持續施予壓力並提高其手臂至出血停止；更嚴重的話，可用繃帶緊緊的將傷口綁起來，15 分鐘後再解開。

(2)個案若感覺頭暈處理方式

*使其留在椅子上，以最舒服的姿勢休息，直到面色好轉。

*將刺激物如綠油精放在其鼻子下，輕扇幾下。

*如果想吐，給予盆子。

*準備濕毛巾置於頸後。

*若昏倒了，予以刺激物如 ammonia 使之甦醒。

*若仍感覺不舒服，則測量其血壓、脈搏，並進一步送醫或打電話請教醫生。

四、尿液收集

1.早上空腹尿液

前一天給予受試者尿杯，請受試者將早上起床的第一次尿液全部收集起來，以冰塊保持低溫狀況，送至醫院。

2.其他時間點尿液

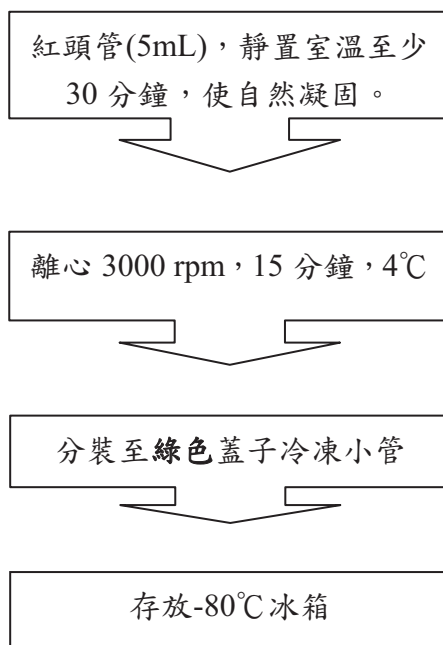
除了早上空腹尿液，本實驗還收集了餐前、餐後 0-2 小時、餐後 2-4 小時以及餐後 4-7 小時尿液。

- (1)將尿杯標上檢體編號，置於裝滿冰塊的容器內，受試者須將同一段時間間隔的所有尿液排放至尿杯中。
- (2)由研究護士定時更換尿杯。
- (3)容器內的冰塊需定時補充，以保持低溫。

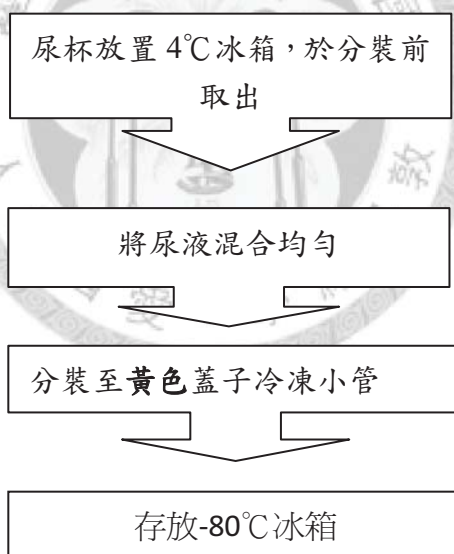


五.檢體處理

1. 血液



2. 尿液



附錄三 個案報告表

CASE REPORT FORM

試驗名稱:

「以代謝體研究法探討植物性食物代謝體與高血壓代謝體之關聯：搜尋關鍵性血壓調控代謝物/代謝體，並探討蔬菜代謝體與血壓調控代謝物（體）及發炎指標的關係」之實驗二：建立蔬菜之人體代謝指紋資料庫



Subject Initials:

--	--	--

Subject Number:

--	--	--

Investigator Name: _____

ELIGIBILITY SCREENING FORM

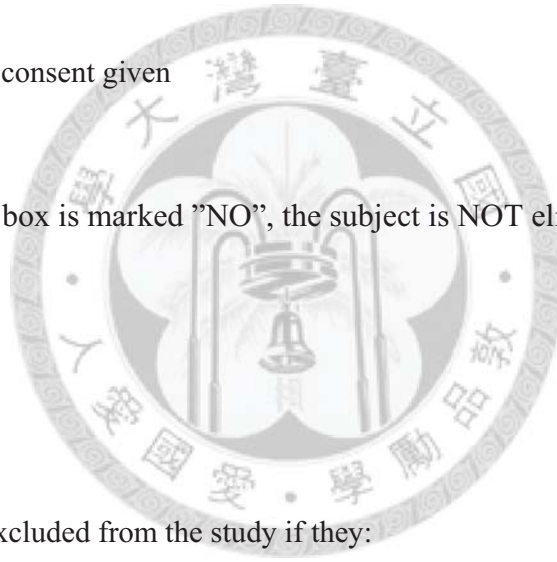
Before entering subject into trial, all of the following items must be marked.

INCLUSION CRITERIA

The subject may be included in the study if they:

1. Age: 18 to 60 years of age Yes No
2. Body mass index:18.5 to 30 (kg/m²) Yes No
3. Non-smoking (no tobacco or nicotine-containing products within 3 months of study entry) Yes No
4. Written informed consent given Yes No

Note that if any box is marked "NO", the subject is NOT eligible for enrollment.



Exclusion criteria

The subject is to be excluded from the study if they:

1. History of immune, hepatic and metabolic disease or other unsuitable disorders e.g. cancer. Yes No
2. History of urinary tract infection or antibiotic use within the previous 3 month Yes No
3. With regular drug intake e.g. anti-hypertensive or anti-diabetes drug. Yes No
4. With regular food supplement e.g. vitamins, herbs Yes No

Note that if any box is marked "YES", the subject is NOT eligible for enrollment.

SCREENING DATA
SOCIODEMOGRAPHIC INFORMATION

Birth Date:

--	--	--	--	--

Month Day Year

Age:

--	--

 years

Sex: Male
 Female

Height:

--	--	--

 cm

Weight:

--	--	--

 .

--	--

 Kg

Body Mass Index:

--	--



STUDY CONDUCT
BLOOD PRESSURE MEASUREMENT
GROUP 1

Day	Interval (Post Lunch)	Values	Comments								
<p style="text-align: center;">Day1</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">M</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">D</td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p style="font-size: 8px; margin-left: 5px;">Y</p>					M	D			Overnight fasting	Temperature: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> . <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> ° C	
	M	D									
	Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute										
	Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute										
	Pre-Lunch Within 15 minutes prior to Lunch	Temperature: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> . <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> ° C									
		Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute									
		Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute									
		Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute									
		Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute									
Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute											
Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute											

STUDY CONDUCT
BLOOD PRESSURE MEASUREMENT
GROUP 1

Day	Interval (Post Lunch)	Values	Comments								
<p style="text-align: center;">Day1</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">M</td> <td style="text-align: center;">D</td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>Y</p>					M	D			1 hour	Temperature: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> ▪ <input type="text"/> ° C	
	M	D									
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute										
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute										
		2 hour	Temperature: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> ▪ <input type="text"/> ° C								
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute										
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute										
		2 hour	Temperature: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> ▪ <input type="text"/> ° C								
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute										
Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute											

STUDY CONDUCT
BLOOD PRESSURE MEASUREMENT
GROUP 1

Day	Interval (Post Lunch)	Values	Comments										
<p style="text-align: center;">Day1</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 15px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 15px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 15px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 15px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 15px; height: 15px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">Y</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">M</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">D</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>						Y	M	D			3 hour	Temperature: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> °C	
	Y	M	D										
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg												
	Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute												
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg												
	Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute												
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg												
	Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute												
	4 hour	Temperature: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> °C											
		Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg											
		Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute											
		Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg											
		Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute											

STUDY CONDUCT
BLOOD PRESSURE MEASUREMENT
GROUP 1

Day	Interval (Post Lunch)	Values	Comments								
<p style="text-align: center;">Day1</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">M</td> <td style="text-align: center;">D</td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>Y</p>					M	D			5 hour	Temperature: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> ▪ <input type="text"/> ° C	
	M	D									
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg										
	Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute										
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg										
	Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute										
	Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg										
	Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute										
	6 hour	Temperature: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> ▪ <input type="text"/> ° C									
		Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg									
		Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute									
Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg											
Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute											
Blood pressure: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg											
Pulse rate <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> beats/minute											

STUDY CONDUCT
BLOOD PRESSURE MEASUREMENT
GROUP 1

Day	Interval (Post Lunch)	Values	Comments								
Day1 <table style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">Y</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">M</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">D</td> <td></td> </tr> </table>					Y	M	D		7 hour	Temperature: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> . <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> °C	
Y	M	D									
		Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute									
		Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute									
		Blood pressure: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mmHg Pulse rate <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> beats/minute									

STUDY CONDUCT
BLOOD SAMPLE COLLECTION
GROUP 1

Day	Collection Date	Sample Intervals	Scheduled Times	Actual Time	Comments
1	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm dd </div>	Overnight fasting	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	
		Pre-Lunch (Hours)	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	
		1	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	
		2	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	
		3	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	
		4	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	
		5	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	
		6	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	
		7	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> mm hh </div>	

STUDY CONDUCT
URINE SAMPLE COLLECTION
GROUP 1

Day	Collection Date	Sample Intervals	Scheduled Times	Actual Time	Comments																								
1	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">dd</td> <td></td> </tr> </table>					mm		dd		Overnight fasting	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh		
mm		dd																											
mm		hh																											
mm		hh																											
		Pre-Lunch (Hours)	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh										
mm		hh																											
mm		hh																											
		0-2	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh										
mm		hh																											
mm		hh																											
		2-4	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh										
mm		hh																											
mm		hh																											
		4-7	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25%; height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">mm</td> <td></td> <td style="text-align: center;">hh</td> <td></td> </tr> </table>					mm		hh										
mm		hh																											
mm		hh																											

STUDY COMPLETION

Date of Last Study Activity

--	--	--	--	--	--

mm

dd

yy

Did the subject complete the study per protocol?

Yes :

No *Specify below (mark one only)*

Adverse Event/intercurrent Illness

Death

Failure to return

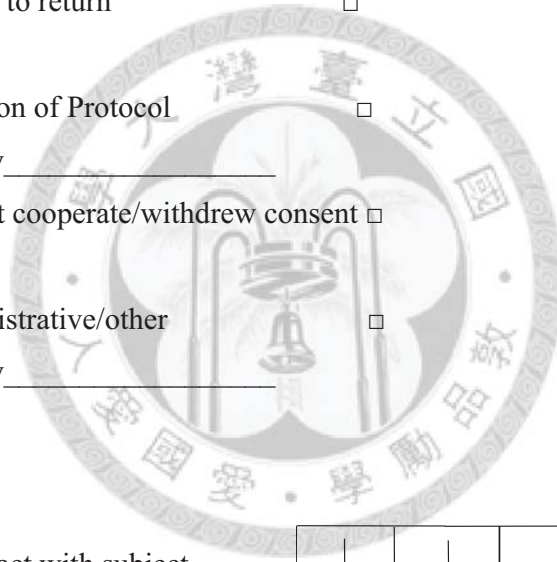
Violation of Protocol

Specify _____

Did not cooperate/withdrew consent

Administrative/other

Specify _____



If No, date of last contact with subject

--	--	--	--	--	--

mm

dd

yy

All data in this case report form have been entered under my responsibility and to the best of my knowledge are accurate and complete.

Signature: _____

Date:

--	--	--	--	--	--

mm

dd

yy