

بررسی میزان آلومینیوم در چای مصرفی کشور

علیرضا عسگری^۱ (M.Sc.)، مهدی احمدی مقدم^۲ (Ph.D.)، امیرحسین محوی^{۳*} (Ph.D.)، مسعود یونسیان^۳ (Ph.D.)

۱- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- گروه مهندسی بهداشت محیط. ۲- دانشگاه علوم پزشکی اهواز- گروه مهندسی بهداشت محیط. ۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران- دانشکده بهداشت- گروه مهندسی بهداشت محیط.

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۹، تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۱۵

چکیده

مقدمه: برگ سیاه چای یکی از منابع مهم آلومینیوم در رژیم غذایی است. این مطالعه با هدف بررسی میزان آلومینیوم در اینفوزیون چای مصرفی کشور طراحی و اجرا شده است. **مواد و روش‌ها:** به‌منظور پایش آلومینیوم در چای مصرفی ایرانی ۲۷ نوع چای (نمونه‌های داخلی و خارجی) از سوپرمارکت‌ها و مغازه‌های سطح شهر خریداری شد و پس از تهیه اینفوزیون در زمان‌های ۱۰ و ۶۰ دقیقه غلظت آلومینیوم توسط روش جذب اتمی قرائت شد و نتایج به‌دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. **نتایج:** در ۱۰ دقیقه اینفوزیون چای باروتی با ۱/۵۹ حد اقل و بامداد با ۱۸/۶۰ میلی‌گرم بر لیتر حداکثر مقدار آلومینیوم را نشان دادند. هم‌چنین در ۶۰ دقیقه اینفوزیون چای ترش مکه با ۱/۲۸ حد اقل و گلستان با ۲۷/۲ میلی‌گرم بر لیتر حداکثر مقدار آلومینیوم را نشان دادند. آنالیز آماری نتایج با استفاده از آزمون t زوج نشان می‌دهد که زمان اینفوزیون به‌طور معناداری بر میزان نشت آلومینیوم به داخل اینفوزیون مؤثر نبوده و با افزایش زمان اینفوزیون غلظت آلومینیوم افزایش نمی‌یابد ($P > 0.05$). محاسبات نشان دادند که اگرچه ۱ لیتر چای ۱۷/۶۸ درصد دریافت روزانه خوراکی آلومینیوم را تشکیل می‌دهد، درصد در دسترس برای جذب در دستگاه گوارش فقط ۸/۴۹ درصد متوسط غلظت کل آلومینیوم می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** بنابراین بر اساس یافته‌های این مطالعه چنین می‌توان گفت که نوشیدن چای به مقدار متوسط نمی‌تواند هیچ اثر سمی بر انسان داشته باشد. اگرچه ذکر این نکته ضروری است که نوشیدن چای ممکن است در افرادی که جذب یا دفع آلومینیوم در بدن آن‌ها دچار مشکل است سمیت آلومینیوم ایجاد کند.

واژه‌های کلیدی: آلومینیوم، چای، اینفوزیون، ایران.

Original Article

Knowledge & Health 2008;3(2): 45-49

Evaluation of Aluminum in Iranian Consumed Tea

Alireza Asgari¹, Mahdi Ahmadi Moghaddam², Amirhossein Mahvi^{3*}, Masoud Yonesian³

1- Dept of Environmental health, Shahrud University of Medical Science, Iran. 2- Dept of Environmental Health, Ahvaz University of Medical Science, Iran. 3- Center for Environmental Research, Tehran University of Medical Science, Iran.

Abstract:

Introduction: Black tea leaf is one of the most important sources of Aluminum in dietary. Therefore this research was conducted to assess the amount of Aluminum in Iranian tea infusion.

Methods: To assess Aluminum in Iranian consumed tea, 27 tea samples were analyzed for Al concentration for 10 and 60 min infusion, aluminum concentration was measured with atomic absorption and the results were analyzed by SPSS.13 version.

Results: The results showed that minimum and maximum concentration of Al in tea infusion for 10 min infusion was 1.59 and 18.60 mg.L⁻¹ respectively in this regard Baroti and Bamdad tea show the highest and lowest concentration respectively in term of Al, Also Statistical analysis with pair T-test showed that infusion time doesn't significantly effects on aluminum leaching into infusion ($P > 0.05$). Calculation of percentage 'available' Al to the human system showed that 1 L of tea can provide 17.68 % of the daily dietary intake of Al, the percentage 'available' for absorption in the intestine is only 8.49 % for overall mean Al concentration.

Conclusion: Therefore based on our results, tea consumption in medium values cannot cause toxic effects on human. Although it is necessary to note that tea consumption might be toxic because of effects on people with absorption or secretion problems.

Keywords: Aluminum, Tea, Infusion, Iran.

Received: 29 May 2008

Accepted: 5 August 2008

*Corresponding author . A. Mahvi, Email: ahmahvi@yahoo.com

نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه مهندسی بهداشت محیط.

تلفن: ۰۹۱۲۳۲۱۱۸۲۷، شماره: ۰۲۱-۸۸۹۵۰۱۸۸، E-mail: ahmahvi@yahoo.com

مقدمه

با توجه به بررسی‌های به‌عمل آمده توسط ستاد پشتیبانی برنامه تنظیم بازار، مصرف سرانه چای در کشور ایران حدود ۱/۵ کیلوگرم برآورد گردیده، کشور ما با دارا بودن یک درصد از جمعیت جهان حدود ۴/۵ درصد از مصرف کل چای جهان را به خود اختصاص داده و این خود مبین گرایش فوق‌العاده مردم سرزمین ما به مصرف این نوشیدنی می‌باشد. از این‌رو کنترل کیفیت این نوشیدنی از نظر آلومینیوم با توجه به وجود رابطه مثبت بین مصرف آب حاوی آلومینیوم زیاد و شیوع بیماری آلزایمر ضروری می‌باشد (۱). آلومینیوم سومین عنصر از نظر فراوانی در روی زمین است و اغلب در خاک، آب و هوا یافت می‌شود. اثرات آلومینیوم در بیماران تحت دیالیز کلیه شناخته شده است، اخیراً نشان داده شده که افزایش غلظت آلومینیوم در مواد غذایی و جذب آن سبب بیماری‌های عصبی از جمله آلزایمر و آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس می‌گردد (۲، ۳ و ۴). از نشانه‌های تشخیصی بیماری آلزایمر، گیجی و افسردگی است. تئوری‌های مختلفی در مورد بیماری آلزایمر پیشنهاد شده است که در حال بررسی‌اند اما اکثر مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند که رابطه مثبتی بین مصرف آب حاوی آلومینیوم زیاد و شیوع بیماری آلزایمر وجود دارد، اگرچه نمی‌توان ثابت کرد که آلومینیوم باعث آن می‌شود. برگ‌های چای سیاه یکی از منابع آلومینیوم است که دارای بالاترین غلظت آلومینیوم است (۵ و ۶). کنترل کیفی چای به عنوان یک نوشیدنی پر مصرف نقش مهمی در سلامت افراد جامعه دارد لذا این مطالعه با هدف بررسی میزان آلومینیوم در اینفوژیون چای مصرفی کشور طراحی و اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه به‌منظور بررسی میزان آلومینیوم در چای مصرفی کشور اقدام به تهیه و خرید انواع چای از سوپرمارکت‌ها و مغازه‌های سطح شهر تهران گردید که در مجموع ۲۷ نمونه چای از انواع داخلی و خارجی گردآوری

شد، سپس نمونه‌های تهیه شده تا قبل از انجام آزمایشات در یک جای خشک (دسیکاتور) و به‌صورت مجزا و به‌دور از هرگونه تماس احتمالی با آلومینیوم قرار داده شد. با توجه به این‌که هدف از این پژوهش تعیین آلومینیوم در اینفوژیون چای و بررسی تأثیر زمان اینفوژیون بر مقدار آلومینیوم می‌باشد لذا از هر نمونه چای خشک، ۲ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب جوشیده و بعد از گذشت زمان‌های ۱۰ و ۶۰ دقیقه، اینفوژیون از صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده شد و پس از هضم اسیدی طبق روش رایج شده در ASTM (انجمن آمریکایی آزمایشات و مواد)، غلظت آلومینیوم موجود توسط روش جذب اتمی قرائت شد و نتایج به‌دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۷).

نتایج

در این مطالعه میانگین غلظت آلومینیوم در ۱۰ دقیقه اینفوژیون برابر ۸/۸۴ میلی‌گرم بر لیتر و در ۶۰ دقیقه برابر با ۱۰/۱۸ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است که نتایج میانگین غلظت آلومینیوم در انواع نمونه‌های مختلف چای کشور در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که در ۱۰ دقیقه اینفوژیون، چای باروتی با ۱/۵۹ حداقل و بامداد با ۱۸/۶۰ میلی‌گرم بر لیتر حداکثر مقدار آلومینیوم را نشان دادند. هم‌چنین در ۶۰ دقیقه اینفوژیون چای ترش مکه با ۱/۲۸ حداقل و گلستان با ۲۷/۲ میلی‌گرم بر لیتر حداکثر مقدار آلومینیوم را نشان دادند. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از آزمون t زوج نشان می‌دهد که زمان اینفوژیون به‌طور معناداری بر میزان نشت آلومینیوم به داخل اینفوژیون مؤثر نبوده و با افزایش زمان اینفوژیون غلظت آلومینیوم افزایش نمی‌یابد ($P > 0.05$). همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود اگرچه ۱ لیتر چای ۱۷/۶۸ درصد دریافت روزانه خوراکی آلومینیوم را تشکیل می‌دهد ولی درصد در دسترس برای جذب در دستگاه گوارش فقط ۸/۴۹ درصد متوسط غلظت کل آلومینیوم می‌باشد.

جدول ۱- غلظت آلومینیوم در اینفوژیون نمونه‌های مختلف چای کشور (به ترتیب حروف الفبا)

نام تجاری چای	غلظت آلومینیوم بعد از ۱۰ دقیقه اینفوژیون	مقدار آلومینیوم نشت کرده از چای خشک به اینفوژیون (میلی‌گرم بر گرم چای خشک)	غلظت آلومینیوم بعد از ۶۰ دقیقه اینفوژیون	مقدار آلومینیوم نشت کرده از چای خشک به اینفوژیون (میلی‌گرم بر گرم چای خشک)	مقدار آلومینیوم نشت کرده از چای خشک به اینفوژیون (میلی‌گرم بر گرم چای خشک)
احمد	۳/۲۰	۰/۱۶	۴/۶۰	۰/۲۳	۰/۲۳
احمد عطری	۷/۴۴	۰/۳۷	۸/۶۰	۰/۴۳	۰/۴۳
الکوزی	۱۳/۴۰	۰/۶۷	۶/۰۶	۰/۳۰	۰/۳۰
باروتی	۱/۵۹	۰/۰۸	۳/۹۵	۰/۲۰	۰/۲۰
بامداد	۱۸/۶۰	۰/۹۳	۲۵/۴۰	۱/۲۷	۱/۲۷
بهاره لاهیجان	۱۰/۵۹	۰/۵۳	۱۴/۸۳	۰/۷۴	۰/۷۴
ترش مکّه	۳/۵۲	۰/۱۸	۱/۲۸	۰/۰۶	۰/۰۶
جهان	۸/۶۵	۰/۴۳	۶/۸۳	۰/۳۴	۰/۳۴
چکش سبز	۱۰/۲۱	۰/۵۱	۱۳/۶۲	۰/۶۸	۰/۶۸
دبش	۸/۱۹	۰/۴۱	۵/۴۸	۰/۲۷	۰/۲۷
دوغال	۸/۹۰	۰/۴۴	۱۰/۱۰	۰/۵۱	۰/۵۱
سبز چینی	۱۷/۷۲	۰/۸۹	۱۵/۱۰	۰/۷۶	۰/۷۶
سیلان	۶/۸۴	۰/۳۴	۳/۳۱	۰/۱۷	۰/۱۷
شاهسوند	۵/۱۴	۰/۲۶	۴/۵۸	۰/۲۳	۰/۲۳
شهرزاد	۱۲/۷۰	۰/۶۴	۱۸/۷۹	۰/۹۴	۰/۹۴
طلا	۲/۹۳	۰/۱۵	۸/۱۳	۰/۴۱	۰/۴۱
عقاب نشان	۶/۵۲	۰/۳۳	۹/۰۴	۰/۴۵	۰/۴۵
قلم سوزنی	۵/۳۸	۰/۲۷	۴/۲۷	۰/۲۱	۰/۲۱
کلکته	۶/۴۹	۰/۳۲	۷/۷۲	۰/۳۹	۰/۳۹
کله مورچه	۹/۵۵	۰/۴۸	۸/۱۳	۰/۴۱	۰/۴۱
گل کیس	۱۶/۴۵	۰/۸۲	۱۹/۱۵	۰/۹۶	۰/۹۶
گلستان	۱۵/۴۵	۰/۷۷	۲۷/۲۰	۱/۳۶	۱/۳۶
محمود	۷/۶۰	۰/۳۸	۱۰/۳۰	۰/۵۲	۰/۵۲
مسما	۷/۵۸	۰/۳۸	۹/۹۷	۰/۵۰	۰/۵۰
نعناع	۴/۳۹	۰/۲۲	۵/۲۲	۰/۲۶	۰/۲۶
نمونه	۱۴/۳۰	۰/۷۲	۱۶/۲۰	۰/۸۱	۰/۸۱
هل زنبق	۵/۴۰	۰/۲۷	۶/۹۳	۰/۳۵	۰/۳۵
تعداد نمونه	۲۷	۲۷	۲۷	۲۷	۲۷
میانگین	۸/۸۴	۰/۴۴	۱۰/۱۸	۰/۵۱	۰/۵۱
حداقل	۱/۵۹	۰/۰۸	۱/۲۸	۰/۰۶	۰/۰۶
حداکثر	۱۸/۶	۰/۹۳	۲۷/۲۰	۱/۳۶	۱/۳۶
انحراف معیار	۴/۶۹	۰/۲۳	۶/۶۱	۰/۳۳	۰/۳۳

بحث

در این مطالعه غلظت آلومینیوم در ۱۰ دقیقه اینفوژیون در محدوده ۱/۵۹-۱۸/۶ میلی‌گرم بر لیتر و با میانگین ۸/۸۴ میلی-گرم بر لیتر و در زمان اینفوژیون ۶۰ دقیقه نیز محدوده غلظت آلومینیوم ۰/۰۶-۲۷/۲۰ با میانگین ۱۰/۱۸ به دست آمد. در مطالعه‌ای غلظت آلومینیوم، مس و روی را در چای تولیدی استان‌های مختلف چین مورد بررسی قرار دادند و غلظت آلومینیوم، مس و روی را به ترتیب ۲/۵-۲/۱، کمتر از ۰/۰۷ و

جدول ۲- درصد در دسترس آلومینیوم برای جذب در دستگاه گوارش

متغیر	مقادیر
متوسط دریافت روزانه از طریق مواد غذایی (%)	۵ (۲-۱۰)
غلظت آلومینیوم بعد از ۱۰ دقیقه اینفوژیون ^{-۱} mgL	۸/۸۴ (۱۸/۶-۱/۵۹)
متوسط دریافت روزانه از طریق ۱ لیتر چای (%)	۱۷/۶۸
در دسترس پذیری در pH زیستی معده (۵) (%)	۴/۸۰
درصد در دسترس برای جذب در دستگاه گوارش	۸/۴۹

متوسط دریافت روزانه از ۱ لیتر چای در مورد آلومینیوم ۵۸/۸ درصد است ولی درصد قابل دسترس ۲/۸۲ درصد مقدار فوق است، آن‌ها این موضوع را به در دسترس پذیری این فلز در pH معده مرتبط دانستند (۵). هم‌چنین با استفاده از داده‌های پائول و همکاران مقدار فلز در دسترس ناشی از ۱ لیتر چای بر اساس درصد متوسط دریافت روزانه از طریق مواد غذایی نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه بررسی شده و برای زمان اینفوژیون ۱۰ دقیقه به‌عنوان حداقل زمان انتقال فلزات به داخل اینفوژیون در جدول ۲ ارائه شده است. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود اگرچه ۱ لیتر چای ۱۷۶/۸ درصد دریافت روزانه خوراکی آلومینیوم را تشکیل می‌دهد ولی درصد در دسترس برای جذب در دستگاه گوارش فقط ۸/۴۹ درصد متوسط غلظت کل آلومینیوم می‌باشد. هم‌چنین ماسوموتو و همکاران در سال ۱۹۷۶ گزارش کردند که فقط درصد کمی از آلومینیوم بلع شده توسط دستگاه گوارش افراد سالم جذب شده و بقیه از طریق کلیه‌ها دفع خواهد شد (۱۵). این مسأله بر این واقعیت استوار است که کل آلومینیوم بدن پایین بوده و با افزایش سن افزایش نمی‌یابد (۱۶). با در نظر گرفتن حداکثر میزان آلومینیوم موجود در نمونه‌های چای در زمان اینفوژیون ۱۰ و ۶۰ دقیقه یعنی ۲۷/۲ میلی‌گرم بر لیتر و مصرف روزانه ۱ لیتر چای، مقدار دریافت هفتگی هر فرد برابر ۱۹۰/۴ میلی‌گرم خواهد بود که در مورد یک فرد ۷۰ کیلوگرمی ۲/۷۲ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن در هفته خواهد بود که این مقدار از استاندارد مقدار دریافت هفتگی مجاز قابل تحمل ۷ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن به مراتب کم‌تر خواهد بود. بنابراین بر اساس یافته‌های این مطالعه چنین می‌توان گفت که نوشیدن چای به مقدار متوسط نمی‌تواند هیچ اثر سمی بر انسان داشته باشد. اگرچه ذکر این نکته ضروری است که نوشیدن چای ممکن است در افرادی که جذب یا دفع آلومینیوم در بدن آن‌ها دچار مشکل است سمیت آلومینیوم ایجاد کند.

۰/۱۷ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند (۸). در مطالعه دیگری غلظت آلومینیوم را در ۴ نوع چای تهیه شده (دم کرده) پس از ۵ دقیقه در ایتالیا مورد بررسی قرار دادند و غلظت آلومینیوم را در همه نمونه‌ها بالاتر از ۵/۹۸-۲/۰۷ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند که نتایج این مطالعه نیز این مطلب را تأیید می‌کند (۹). در مطالعه‌ای که در کشور انجام شده میزان فلزات سنگین سرب، کادمیم، نیکل و آلومینیوم را در چای‌های داخلی و وارداتی بررسی کرده و گزارش کردند که میزان نیکل، سرب و کادمیم در هر دو گروه چای (داخلی و وارداتی) پایین‌تر از حد قابل تشخیص بوده اما متوسط مقدار آلومینیوم در چای داخلی ۶۹۹/۲۱ و در چای وارداتی ۳۸۸/۳۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوده است و اختلاف معناداری بین دو گروه چای مشاهده شد (۱۰).

درصد آلومینیوم در دسترس برای جذب در دستگاه گوارش: مطالعات انجام شده در سال ۱۹۹۴ برداشت روزانه آلومینیوم توسط افراد چینی از طریق مواد غذایی را ۹-۱۲ میلی‌گرم گزارش می‌کند (۱۱). آلومینیوم در سال ۱۹۹۹ توسط کمیته مشترک کارشناسان مواد افزودنی سازمان‌های بهداشت جهانی و کشاورزی و غذا به‌عنوان یک آلاینده مواد غذایی مطرح شد که مقدار دریافت هفتگی مجاز قابل تحمل را ۷ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن مطرح می‌کند (۱۲). مطالعات مختلفی به منظور ارزیابی دریافت روزانه آلومینیوم از طریق مواد غذایی مختلف انجام شده است. مطالعات نشان داده‌اند که این مقدار برای افراد هندی ۲۳ میلی‌گرم در روز (۱۳) و برای آمریکایی‌ها و برای مردان بزرگسال ژاپنی ۸/۱-۲/۲ میلی‌گرم در روز می‌باشد (۱۴). سهم نوشیدن چای در جذب مواد معدنی به خوبی مشخص نشده است (۵) و از آن‌جاکه در دسترس-پذیری زیستی بسیاری از فلزات در چای نامشخص است در سال ۱۹۹۸ پائول و همکاران مطالعاتی را در مورد در دسترس پذیری فلزات در چای در تحت شرایط شبیه‌سازی شده معده انسان انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که اگرچه درصد

8. Wong MH, Zhang ZQ, Wong JWC, Lan CY. Trace metal contents (Al, Cu, and Zn) of tea: tea and soil from two tea plantation, and tea products from different provinces of china. *Environmental Geochemistry and Health* 1998;20(2):87-94.
9. Rajwanshi P, Singh V, Gupta MK, Kumari V, Shrivastav R, Ramanamurthy M, et al. Studies on aluminum leaching from cookware in tea and coffee and estimation of aluminum content in toothpaste, baking powder and paa masala. *Sci Total Environ* 1997;193(3):243-249.
- 10- Vicamolís K, Hassanpor MH. The evaluating of heavy metals (Pb, Cd, Ni, Al) in the Iranian and imported tea. *Proceeding of the third International Congress of Iranian Food Industries*;2003;Tehran, Iran.Persian.
11. Wang L, Su D, Wang Y. Studies on the aluminum content in Chinese foods and the maximum permitted levels of aluminum in wheat flour products. *Biomed Environ Sci* 1994;7(1):91-99.
12. Expert Committee on Food Additives JECFA (Joint FAO/WHO). Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Washington:International Life Sciences Institute Press;1999.
13. Rao KSJ. Aluminum content in tea leaves and in differently prepared tea infusions. *Die Nahrung* 1994;38:533-537.
14. Greger JL., Dietary and other sources of aluminum intake. *Ciba found symp* 1992;169:26-49.
15. Matsumoto H, Hirasawa E, Morimura S, Takahashi S. Localization of aluminum in tea leaves. *Plant and Cell Physiology* 1976;17(3):627-631.
16. Ozdemir Y, Gucer S. Speciation of manganese in tea leaves and tea infusions. *Food Chemistry* 1998;61(3):313-317.

تشکر و قدردانی

این مقاله از نتایج طرح تحقیقاتی با عنوان «بررسی میزان فلزات سنگین کادمیوم، سرب، روی و عنصر آلومینیوم در اینفوژیون چای مصرفی کشور» استخراج شده که بودجه آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران تأمین شده است، لذا به این وسیله مراتب تشکر و قدردانی نویسندگان از آن معاونت محترم اعلام می‌گردد.

منابع

1. Research deputy, report on the country condition of tea. Tehran: The Country Organization of Tea;2006.p.24-25.
2. Mclachlan DRC. Aluminum and the risk for Alzheimer's disease. *Environmetrics* 1995;6:233-275.
3. Jackson ML, Huang PM. Aluminum of acid soils in the food chain and senility. *Sci Total Environ* 1983;28:269-276.
4. Koch KR. Quantitative determination of aluminums in tea by means of aluminium-27 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analyst*1990;115(6):823-825.
5. Powell JJ, Burden TJ, Thompson RP. In vitro mineral availability from digested tea: a rich dietary source of manganese. *Analyst* 1998;123(8):1721-1724.
6. Flaten AK, Lund W. Speciation of aluminum in tea infusions studied by size exclusion chromatography with detection by post-column reaction. *Sci Total Environ* 1997;207(1):21-28.
7. American Society of Testing and Material (ASTM). Standard guide for preparation of biological samples for inorganic chemical analysis. Annual book of ASTM. USA: Pennsylvania;1999.