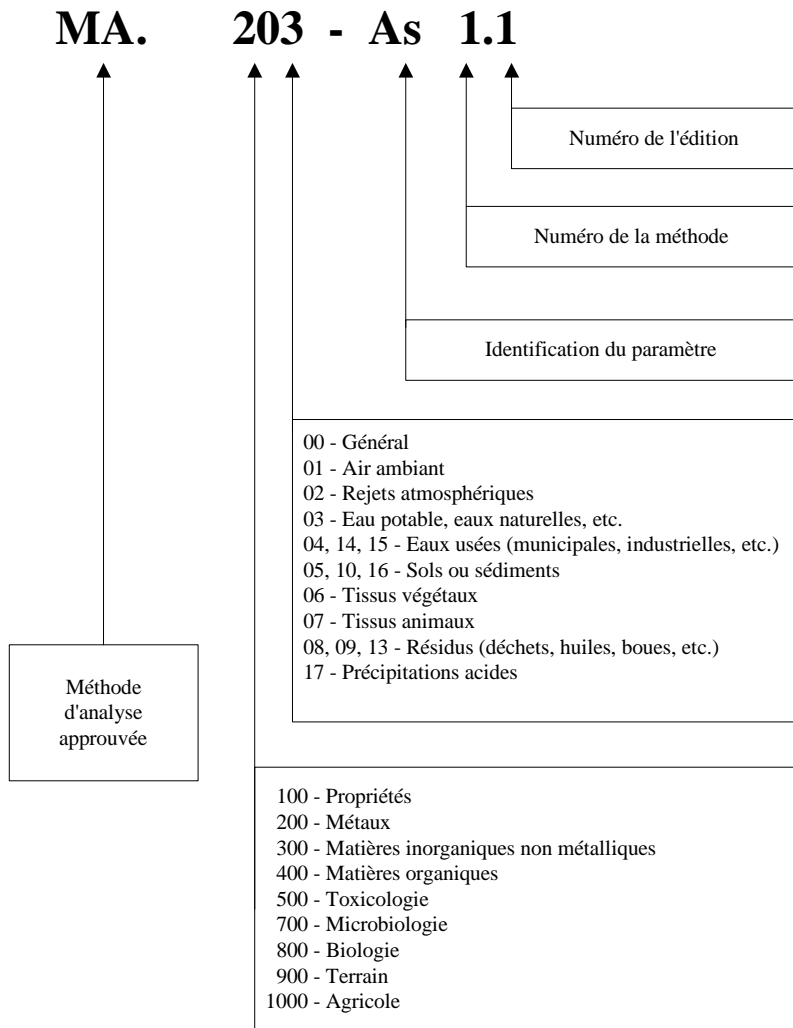


**MA. 207- Mét 1.0**  
Édition : 2003-12-11

## **Méthode d'analyse**

Détermination des métaux dans les tissus animaux :  
méthode par spectrométrie d'émission  
au plasma d'argon après minéralisation acide

## Exemple de numérotation :



**ÉDITION APPROUVÉE LE :** 11 décembre 2003

### Historique de la méthode

Ce document constitue la première édition de cette méthode. Elle remplace la méthode MENVIQ 86.10/207 – Mét 1.1, intitulée « Milieu biologique - Détermination des métaux : méthode par spectrométrie d'émission au plasma d'argon », publiée en 1986.

**Reproduction et traduction, même partielles, interdites sans l'autorisation du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, ministère de l'Environnement du Québec.**

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC.  
Détermination des métaux dans les tissus animaux : méthode par spectrométrie au plasma d'argon après minéralisation acide, MA. 207 – Mét 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, 2003, 19 p.



## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
1. DOMAINE D'APPLICATION	7
2. PRINCIPE ET THÉORIE	7
3. FIABILITÉ	8
3.1. Interférence	8
3.2. Limite de détection	8
3.3. Limite de quantification	8
3.4. Sensibilité	9
3.5. Fidélité	9
3.6. Justesse	10
3.7. Pourcentage de récupération	10
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	11
5. APPAREILLAGE	11
6. RÉACTIFS ET ÉTALONS	12
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	14
7.1. Préparation de la verrerie	14
7.2. Préparation des échantillons	14
7.3. Minéralisation des échantillons	15
7.4. Dosage	16
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	16
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	16
10. BIBLIOGRAPHIE	17



## INTRODUCTION

La présence de métaux dans l'environnement est causée principalement par l'action des agents atmosphériques sur les roches et les sédiments, le lessivage des sols et les rejets industriels. Plusieurs métaux présentent un intérêt pour l'environnement, car ils peuvent avoir des effets bénéfiques ou toxiques. Un métal, selon sa concentration, peut être à la fois essentiel et dangereux.

Les métaux peuvent s'accumuler dans les tissus biologiques, notamment dans la chair des poissons. Au Québec, le réseau de suivi des substances toxiques permet de surveiller la concentration de métaux lourds dans la chair des poissons.

### 1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode sert à déterminer le cadmium, le chrome, le cuivre, le manganèse, le nickel, le plomb, le strontium et le zinc dans les tissus biologiques. Le tableau suivant montre les concentrations minimales et maximales qui peuvent être dosées.

Métal	Limite inférieure µg/kg poids sec	Limite supérieure µg/kg poids sec	Limite inférieure µg/kg poids humide	Limite supérieure µg/kg poids humide
Cd	15	50 000	3	10 000
Cr	100	50 000	25	10 000
Cu	200	50 000	50	10 000
Mn	100	50 000	25	10 000
Ni	115	50 000	500	10 000
Pb	300	50 000	100	10 000
Sr	50	50 000	12	10 000
Zn	100	50 000	25	10 000

### 2. PRINCIPE ET THÉORIE

Dans une première étape, l'échantillon est séché et homogénéisé. Il est ensuite minéralisé avec de l'acide nitrique et de l'acide chlorhydrique dans un bain de sable qui maintient la température constante à 150 °C. Du peroxyde d'hydrogène est ajouté pour détruire la matière organique.

Le dosage est effectué avec un spectromètre à émission au plasma d'argon induit par radiofréquence ou ICP. Le plasma est produit par un phénomène d'induction dans une torche localisée à l'intérieur d'une bobine. Il est amorcé grâce à une décharge électrique qui produit des électrons libres et des ions d'argon. Ces espèces sont soumises au champ magnétique créé dans la bobine d'induction. Les électrons sont accélérés dans le champ magnétique et produisent un courant induit. Avec les ions, ils vont produire des collisions qui créent et entretiennent le plasma et qui produisent aussi l'atomisation, l'excitation et l'ionisation. L'échantillon est entraîné dans ce plasma. Les métaux sont atomisés à des températures pouvant atteindre 10 000 K et émettent de l'énergie lumineuse à des longueurs d'onde qui leur sont spécifiques. La

lumière émise est séparée par un réseau dispersif et son intensité est mesurée à l'aide d'un détecteur solide à canaux multiples.

Les concentrations des éléments en solutions sont déterminées en comparant les intensités lumineuses respectives de l'échantillon et des solutions étalons. Les résultats sont par la suite reportés à l'échantillon en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  poids sec ou  $\mu\text{g}/\text{kg}$  poids humide.

### 3. FIABILITÉ

Les termes suivants sont définis dans le document DR-12-VMC, intitulé « Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie ».

#### 3.1. INTERFÉRENCE

Les interférences les plus fréquentes sont les interférences interéléments et les déplacements de ligne de base. Elles sont corrigées à l'aide d'un programme informatique nommé MSF (*Multicomponent Spectral Fitting*).

#### 3.2. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection de la méthode (LDM), déterminée pour  $n = 10$  pour chaque élément, est indiquée dans le tableau suivant.

Métal	LDM $\mu\text{g}/\text{kg}$ poids sec	LDM $\mu\text{g}/\text{kg}$ poids humide
Cd	15	3
Cr	100	25
Cu	200	50
Mn	100	25
Ni	115	500
Pb	300	100
Sr	50	12
Zn	100	25

#### 3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification de la méthode (LQM), déterminée pour  $n = 10$  pour chaque élément, est indiquée dans le tableau suivant.

Métal	LQM $\mu\text{g}/\text{kg}$ poids sec	LQM $\mu\text{g}/\text{kg}$ poids humide
Cd	45	9
Cr	300	75
Cu	600	150
Mn	300	75
Ni	345	1500

Métal	LQM µg/kg poids sec	LQM µg/kg poids humide
Pb	900	300
Sr	1500	36
Zn	300	75

### 3.4. Sensibilité

La sensibilité de la méthode (LQM) pour chaque élément est indiquée dans le tableau suivant.

Métal	Sensibilité unité/mg/l
Cd	22 400
Cr	26 600
Cu	9 500
Mn	13 100
Ni	508
Pb	2 250
Sr	812 000
Zn	33 700

### 3.5. FIDÉLITÉ

#### 3.5.1 Réplicabilité

La réplicabilité d'une série de mesures (n = 10) est indiquée dans le tableau suivant.

Métal	Réplicabilité mg/kg poids sec	Concentration mg/kg poids sec
Cd	0,0008	0,0193
Cr	0,002	0,116
Cu	0,005	0,161
Mn	0,002	0,074
Ni	0,02	0,26
Pb	0,014	0,285
Sr	0,0006	0,0260
Zn	0,003	0,208

### 3.5.2 Répétabilité

La répétabilité d'une série de mesures (n = 10) est indiquée dans le tableau suivant.

Métal	Répétabilité mg/kg poids sec	Concentration mg/kg poids sec
Cd	2,95	25,9
Cr	0,09	1,99
Cu	12,5	390
Mn	0,95	21,1
Ni	0,28	2,69
Pb	1,18	10,1
Sr	4,28	108
Zn	5,3	153

### 3.6. JUSTESSE

Lors d'essais (n = 10), la justesse présentée dans le tableau suivant a été obtenue.

Métal	Justesse %	Valeur attendue mg/kg poids sec
Cd	98	26,3
Cr	91	2,40
Cu	89	439
Mn	90	23,4
Ni	83	2,30
Pb	97	10,4
Sr	96	113
Zn	86	177

### 3.7. POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION

Lors d'essais (n = 10), la récupération présentée dans le tableau suivant a été obtenue.

Métal	Récupération %	Concentration ajoutée mg/kg poids sec
Cd	109	0,303
Cr	91	1,21
Cu	96	1,82
Mn	94	0,923
Ni	95	3,03
Pb	95	3,04
Sr	103	1,85
Zn	98	5,41

#### 4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

Prélever un échantillon représentatif dans un sac de plastique. Congeler l'échantillon à -20 °C. Le délai de conservation entre le prélèvement et l'analyse ne doit pas excéder 6 mois. Si les poissons doivent être éviscérés, l'opération est effectuée immédiatement après le prélèvement, tout en conservant les organes pour les analyses ultérieures. Le mode de conservation demeure le même que celui indiqué plus haut.

#### 5. APPAREILLAGE

Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

- 5.1. Spatule ou scalpel
- 5.2. Coupelle de téflon ou de plastique pouvant résister à une température de 150 °C
- 5.3. Balance (précision  $\pm 0,1$  mg)
- 5.4. Contenants de téflon d'environ 50 ml munis d'un couvercle pouvant être vissé
- 5.5. Plaque chauffante Thermolyne, modèle 2200, et bac à sable
- 5.6. Mortier et pilon avec surface lisse
- 5.7. Étude (Thermolyne)
- 5.8. Pipettes, embouts de micropipettes, fioles volumétriques en plastique (PE ou PP)
- 5.9. Spectromètre d'émission au plasma d'argon de marque Perkin Elmer, modèle Optima 3000 DV
- 5.10. Chambre de nébulisation cyclonique
- 5.11. Nébuliseur Burgener Peek Mira Mist
- 5.12. Module de régulation de l'échantillonneur de marque Perkin Elmer, modèle AS90/AS91
- 5.13. Échantillonneur de marque Perkin Elmer, modèle AS90 avec plateau d'échantillonnage B
- 5.14. Pompe péristaltique de marque Perkin Elmer (3 tubes)
- 5.15. Recirculateur d'eau de marque Neslab, modèle CFT-33
- 5.16. Micro-ordinateur de marque DELL, modèle OptiPlex GX1
- 5.17. Écran de marque NOKIA
- 5.18. Imprimante à laser de marque Lexmark, modèle Optra E

- 5.19. Tubes de 15 ml en polypropylène (PP) de forme conique
- 5.20. Tubes pour la pompe péristaltique : un tube noir-noir (0,32 ml/min) pour la prise d'échantillon, un tube rouge-rouge (0,80 ml/min) pour le retour du nébuliseur et un tube rouge-rouge (0,80 ml/min) pour l'alimentation de l'eau de rinçage
- 5.21. Logiciel d'exploitation ICP WinLab32 de marque Perkin Elmer

## 6. RÉACTIFS ET ÉTALONS

Lorsque l'utilisation de réactifs commerciaux de qualité particulière est nécessaire, une mention à cet effet est ajoutée après le nom du produit.

À moins d'indication contraire, l'eau utilisée pour la préparation des réactifs et des solutions étalons est de l'eau déminéralisée ultra-pure dont la résistivité mesurée est égale ou supérieure à 18 mégohm-cm.

- 6.1. Argon (CAS n° 7440-37-1)
- 6.2. Acide nitrique (qualité métal trace), HNO<sub>3</sub> (CAS n° 7607-37-2)
- 6.3. Acide chlorhydrique (qualité métal trace), HCl (CAS n° 7647-01-1)
- 6.4. Peroxyde d'hydrogène 30 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CAS n° 7722-84-1)
- 6.5. Chloramine-T (CAS n° 7080-50-4)
- 6.6. Solution étalon de cadmium de 1 000 mg/l (qualité PlasmaCal)
- 6.7. Solution étalon de chrome de 1 000 mg/l (qualité PlasmaCal)
- 6.8. Solution étalon de cuivre de 1 000 mg/l (qualité PlasmaCal)
- 6.9. Solution étalon de nickel de 1 000 mg/l (qualité PlasmaCal)
- 6.10. Solution étalon de manganèse de 1 000 mg/l (qualité PlasmaCal)
- 6.11. Solution étalon de plomb de 1 000 mg/l (qualité PlasmaCal)
- 6.12. Solution étalon de strontium (qualité Plasma Cal)
- 6.13. Solution étalon de zinc de 1 000 mg/l (qualité PlasmaCal)
- 6.14. Savon Extran 300
- 6.15. Solution de lavage, HNO<sub>3</sub>, 0,2 % V/V

Dans une fiole volumétrique de 2 000 ml contenant 500 ml d'eau, ajouter 4 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (cf. 6.2) et compléter au trait de jauge avec de l'eau.

6.16. Solution témoin (blanc d'étalon)

Dans une fiole jaugée de 200 ml contenant environ 100 ml d'eau, ajouter 13 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (cf. 6.2) et 7 ml d'acide chlorhydrique concentré (cf. 6.3) et compléter au trait de jauge avec de l'eau. Cette solution est refaite chaque fois que des solutions étalons sont fabriquées.

6.17. Solution étalon mère n° 1 (10 mg/l Mn, Ni, Zn)

Préparer la solution étalon mère n° 1 tel que décrit au tableau 1 de l'annexe 1. Cette solution peut être conservée durant six mois.

6.18. Solution étalon mère n° 2 (10 mg/l Cd et Cr et 20 mg/l Cu)

Préparer la solution étalon mère n° 2 tel que décrit au tableau 1 de l'annexe 1. Cette solution peut être conservée durant six mois.

6.19. Solution étalon mère n° 3 (10 mg/l Sr)

Préparer la solution étalon mère n° 3 tel que décrit dans le tableau 1 de l'annexe 1. Cette solution peut être conservée durant six mois.

6.20. Solution étalon mère n° 4 (10 mg/l Pb)

Préparer la solution étalon mère n° 4 tel que décrit dans le tableau 1 de l'annexe 1. Cette solution peut être conservée durant six mois.

6.21. Solutions étalons de travail n°s 1 à 4

Préparer les solutions étalons de travail nos 1 à 4 en diluant chaque solution étalon mère d'un facteur 20 dans la matrice.

Dans 4 fioles volumétriques de 200 ml contenant environ 100 ml d'eau, introduire 13 ml d'acide nitrique concentré (cf. 6.2), 7 ml d'acide chlorhydrique concentré (cf. 6.3) et 10 ml de la solution étalon mère d'intérêt (cf. 6.17 à 6.20) et compléter au trait de jauge avec de l'eau. Les concentrations seront de 20 fois inférieures à celles des solutions mères, soit 0,5 mg/l Mn, Ni, Zn, Cd, Cr, Sr et Pb et 1,0 mg/l Cu. Cette solution peut être conservée durant six mois.

6.22. Solution du recirculateur, chloramine-T, 0,250 g/l

Remplir une bouteille de 4 l munie d'un robinet avec de l'eau distillée et ajouter 1,0 g de chloramine-T (cf. 6.5). Cette solution peut être conservée durant un mois.

**Note – Pour cette solution, l'eau ne doit pas être ultra-pure, mais bien de l'eau distillée.**

## 7. PROTOCOLE D'ANALYSE

Pour toute série d'échantillons, les recommandations des « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en chimie », DR-12-SCA-01, sont suivies afin de s'assurer d'une fréquence d'insertion adéquate en ce qui concerne les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité (blanc, matériaux de référence, duplicata, etc.). Tous ces éléments d'assurance et de contrôle de la qualité suivent les mêmes étapes du protocole analytique que les échantillons.

### 7.1. PRÉPARATION DE LA VERRERIE

**Note – Le terme verrerie s'applique dans ce cas à des contenants de plastique ou de téflon**

- Laisser tremper la verrerie dans un bain d'acide nitrique 20 % (V/V) durant 16 heures.
- Enlever la verrerie du bain d'acide et la rincer 7 fois avec de l'eau ultra-pure.
- Réserver la verrerie ainsi décontaminée.

### 7.2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

- Envelopper une planche à découper avec une feuille d'aluminium, le côté mat vers l'extérieur.
- Rincer tout le matériel avec de l'éthanol en incluant le moulin à viande et ses composantes, les couteaux à filets, les cuillères, les bocaux, etc., et assécher.
- Laisser l'échantillon décongeler.
- Faire des filets et passer les filets au moulin à viande à trois reprises en prenant soin de bien mélanger entre chaque broyage.
  - Utiliser une grille avec des ouvertures moyennes (4 - 4,5 mm) pour le premier broyage et une grille avec des petites ouvertures (2 - 2,5 mm) pour les broyages subséquents.
- Le matériel est nettoyé entre chaque échantillon de la façon suivante :
  - laver au moyen d'un jet d'eau chaude et d'une brosse en métal chaque pièce venant en contact avec l'échantillon;
  - rincer à deux reprises chaque pièce avec de l'eau et effectuer deux autres rinçages avec de l'éthanol;
  - assécher et remonter le moulin à viande en prenant soin de ne pas contaminer les pièces.

**Utiliser des gants en nitrile pour manipuler les pièces venant en contact avec l'échantillon.**

- L'homogénat est ensuite placé dans un sac en plastique, plié et conservé à une température se situant entre -10 et -20 °C.

**7.3. MINÉRALISATION DES ÉCHANTILLONS**

- Laisser l'échantillon décongeler partiellement à la température ambiante. L'échantillon peut être broyé ou être constitué d'un tissu biologique entier.
- Prélever environ 5 g de l'échantillon humide dans une coupelle de plastique ou de téflon avec une spatule s'il s'agit d'un échantillon broyé, ou avec un scalpel si l'échantillon n'est pas broyé.

**Note – Si le pourcentage d'eau est requis, inscrire le poids de la coupelle et le poids de l'échantillon humide.**

- Placer l'échantillon à l'étuve et laisser sécher durant au moins 48 heures à 103 °C ± 5 °C.
- Peser, au besoin, et transférer dans un mortier sec à surface lisse préalablement nettoyé avec du savon Extran 300 (cf. 6.14). Rincer avec de l'acide nitrique dilué et de l'eau ultra-pure. Sécher et répéter le nettoyage entre chaque échantillon.
- Broyer jusqu'à ce que la chair soit pulvérisée et homogène. Conserver cette poudre dans un contenant de plastique décontaminé.
- Prélever environ 300 mg de l'échantillon sec et noter le poids.
- Déposer dans un contenant de téflon muni d'un couvercle.
- Ajouter 5 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (cf. 6.2) et laisser reposer environ 30 minutes sous la hotte sans refermer le couvercle hermétiquement.
- Enfoncez les contenants de téflon, sans leurs couvercles, dans un bain de sable et chauffer (à environ 150 °C ± 10 °C) jusqu'à ce que le volume atteigne environ 0,5 à 1,0 ml. La durée du chauffage pourra être près de 1 heure.
- Ajouter 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (cf. 6.4) et laisser évaporer de moitié sans porter à sec. La durée du chauffage sera d'environ 30 minutes.

**NOTE – Il est important de ne pas évaporer à sec afin d'éviter une combustion spontanée.**

- Ajouter 2 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (cf. 6.2) et 1 ml de HCl concentré (cf. 6.3).

**NOTE – Un dégagement gazeux et une effervescence seront provoqués par l'ajout des acides.**

- Laisser le gaz s'échapper pendant quelques minutes en agitant légèrement.
- Refermer hermétiquement et déposer dans le bain de sable. Laisser chauffer durant 1 heure. Après environ 30 minutes, ouvrir délicatement le couvercle pour enlever la pression dans le contenant et laisser le gaz s'évacuer.
- Après 1 heure de chauffage, immerger les contenants de téflon dans de l'eau froide durant 10 à 15 minutes pour faire baisser la pression.
- Ouvrir délicatement le contenant de téflon et transférer le tout dans un tube de polypropylène de 50 ml.
- Rincer le contenant de téflon avec plusieurs volumes d'eau afin d'atteindre un volume exact de 30 ml dans le tube.
- Refermer le tube et agiter fortement afin de rendre homogène.

#### 7.4. DOSAGE

Le dosage des échantillons est effectué à l'aide d'un spectromètre d'émission au plasma d'argon de marque Perkin Elmer, modèle Optima 3000 DV. La chambre de nébulisation cyclonique et le nébuliseur Burgener Peek Mira Mist sont utilisés. Au besoin, les échantillons sont dilués afin de respecter les limites supérieures de l'instrument.

### 8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats sont obtenus à l'aide d'un traitement informatisé des données et sont exprimés en mg/l pour chacun des métaux dosés. Les résultats finaux sont exprimés en mg/kg d'échantillon en poids sec, selon l'équation suivante :

$$C = [(A \times V) \div P] \times F$$

où

- C : concentration du métal dans l'échantillon (mg/kg);
- A : concentration du métal dans la solution dosée (mg/l);
- V : volume final en ml;
- P : prise d'échantillon en gr;
- F : facteur de dilution de la solution dosée, si nécessaire.

### 9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les critères d'acceptabilité sont définis au document DR-12-SCA-01 et sont appliqués comme suit :

En ce qui concerne les matériaux de référence et matériaux de référence certifiés, les critères d'acceptabilité sont définis par le responsable désigné.

La valeur du blanc de méthode ne doit pas dépasser trois fois la limite de détection pour chacun des métaux d'intérêt.

L'étalonnage est accepté si la concentration des échantillons de contrôle de l'étalonnage se situe entre des valeurs de référence définies par le responsable désigné et inscrites sur les feuilles de travail ou tout autre document de référence pertinent.

Les résultats des duplicata et des replica ne doivent pas différer de plus de 15 % de la valeur moyenne ou de plus de deux fois la limite de détection, selon la concentration analysée.

Les ajouts dosés doivent permettre un recouvrement des composés d'intérêt dans la même plage de recouvrement acceptée pour une matrice donnée, selon les critères d'acceptabilité définis par le responsable désigné.

Les résultats des échantillons de contrôle insérés dans les routines d'analyse sont acceptés par le système de gestion des analyses lorsqu'ils sont compris à l'intérieur de l'écart attendu.

Les chimistes peuvent valider les résultats des analyses à partir de l'ensemble des données du contrôle de la qualité, même s'il y a dépassement des critères.

## 10. BIBLIOGRAPHIE

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, 1998.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en chimie, DR-12-SCA-01, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie, DR-12-VMC, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.



## Méthode pour les tissus animaux

**Tableau 1** : Préparation des solutions étalons mères pour le dosage multiéléments (solutions 6.17 à 6.20)

Dans 4 fioles volumétriques de 200 ml contenant environ 100 ml d'eau, introduire à l'aide de pipettes les volumes suivants des solutions étalons mères de 1 000 mg/l. Ajouter 13,0 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (cf. 6.2) et 7,0 ml de HCl concentré (cf. 6.3) et compléter au trait de jauge avec de l'eau. Préparer un blanc avec seulement les acides.

<b>SOLUTIONS ÉTALONS MÈRES</b>				
Analyte	Étalon n° 1 (Solution 6.17)	Étalon n° 2 (Solution 6.18)	Étalon n° 3 (Solution 6.18)	Étalon n° 4 (Solution 6.20)
Cd		2 ml (cf. 6.6)		
Cr		2 ml (cf. 6.7)		
Cu		4 ml (cf. 6.8)		
Mn	2 ml (cf. 6.10)			
Ni	2 ml (cf. 6.9)			
Pb				2 ml (cf. 6.11)
Sr			10 ml (cf. 6.12)	
Zn	2 ml (cf. 6.13)			