

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print

ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet10714

<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 619:620.266.1:621.039.66:577.118

Validation of the method for determining toxic elements, micro- and macroelements in biological samples using atomic emission inductively coupled plasma (ICP OES)

S. V. Shuliak¹, O. M. Chechet¹, O. S. Haidei^{1✉}, Yu. V. Dobrozhan¹, O. L. Kravtsova¹, I. Yu. Bardyk¹,
O. V. Krushelnyska², B. V. Gutyj²

¹State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv, Ukraine

²Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine

Article info

Received 04.07.2022

Received in revised form

04.08.2022

Accepted 05.08.2022

State Scientific and Research
Institute of Laboratory Diagnostics
and Veterinary and Sanitary
Expertise, Donetska Str., 30,
Kyiv, 03151, Ukraine.
Tel.: +38-067-171-15-58
E-mail: olga.gaidei@gmail.com

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.
Tel: +38-068-136-20-54
E-mail: bvh@ukr.net

Shuliak, S. V., Chechet, O. M., Haidei, O. S., Dobrozhan, Yu. V., Kravtsova, O. L., Bardyk, I. Yu., Krushelnyska, O. V., & Gutyj, B. V. (2022). Validation of the method for determining toxic elements, micro- and macroelements in biological samples using atomic emission inductively coupled plasma (ICP OES). Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 24(107), 82–87. doi: 10.32718/nvlvet10714

The relevance of the problem of determining toxic elements and micro-macroelements in biological fluids is increasing in connection with the pollution of the environment by such chemical elements as Lead, Fluorine, Cadmium, Mercury, Manganese, Copper, etc. Toxic elements in technological processing with gaseous, solid, and liquid waste enter the environment, forming artificial biogeochemical provinces in cities and industrial complexes. In this regard, the content of many chemical elements in the air, soil, reservoirs, and the organism of animals and plants, which the population uses as food products, increases. At the same time, trace elements are the essential catalysts of metabolic processes and play an important role in the body's adaptation. Metals are an essential structural component of biological macromolecules, ensuring their normal functioning. Although minerals do not have energy value like proteins, fats, and carbohydrates, many enzymatic processes in the body are impossible without their participation. An excess of metal can lead to the development of a pathological process, and an imbalance between essential elements causes severe disturbances in body functions. In most cases, the elemental content of the blood (plasma, serum) is an informative indicator of the state of the animal's organism. The method for determining 17 metals (Aluminum, Strontium, Arsenic, Boron, Cadmium, Chromium, Cobalt, Copper, Ferrum, Lead, Manganese, Molybdenum, Selenium, Argentum, Sodium, Zinc, Sodium, Phosphorus, Potassium, Calcium) in biological samples was validated (blood, serum, urine) by the method of optical emission inductively coupled plasma and determined validation characteristics of the way, namely: limit of detection, the limit of quantification, accuracy, correctness, convergence, reproducibility, selectivity, linearity, working range. This method was found simple, sensitive, practical, and universal, as confirmed by LOD and LOQ data. The way shows good linearity in the range of 1–1000 µg/l, depending on the investigated metal. The way is selective and precise. The obtained validation data meet the requirements of the Eurachem Guidelines.

Key words: micro-, macroelements, toxic elements, ICP OES, biological samples, validation.

Валідація методу визначення токсичних елементів, мікро-, макроелементів у біологічних зразках за допомогою атомно-емісійної індуктивно-зв'язаної плазми (ICP OES)

С. В. Шуляк¹, О. М. Чечет¹, О. С. Гайдей^{1✉}, Ю. В. Доброжан¹, О. Л. Кравцова¹, І. Ю. Бардик¹,
О. В. Крушельницька², Б. В. Гутий²

¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ, Україна

²Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

Актуальність проблеми визначення токсичних елементів, мікро - макроелементів у біологічних рідинах зростає у зв'язку із забрудненням довкілля такими хімічними елементами, як Свинець, Фтор, Кадмій, Ртуть, Марганець, Мідь та ін. Токсичні елементи у процесі технологічної переробки з газоподібними, твердими і рідкими відходами надходять у довкілля, що формує в містах і промислових комплексах штучні біогеохімічні провінції. У зв'язку з цим збільшується вміст багатьох хімічних елементів у повітрі, ґрунтах, водоймищах, організмі тварин і рослин, які використовуються населенням як харчові продукти. Разом з тим мікроелементи є найважливішими каталізаторами обмінних процесів і відіграють важливу роль в адаптації організму. Метали є обов'язковим структурним компонентом біологічних макромолекул, забезпечуючи їх нормальне функціонування. Незважаючи на те, що мінеральні речовини не мають енергетичної цінності, як білки, жири і вуглеводи, багато ферментативних процесів в організмі неможливі без їхньої участі. Не лише надлишок металу може призвести до розвитку патологічного процесу, а й дисбаланс між есенціальними елементами викликає важкі порушення функцій організму. В більшості випадків елементний вміст складу крові (плазми, сироватки) є інформативним показником стану організму тварини. Валідовано метод визначення 17 металів (Алюмінію, Стибію, Арсену, Бору, Кадмію, Хрому, Кобальту, Купруму, Феруму, Плюмбуму, Мангану, Молибдену, Селену, Аргентуму, Натрію, Цинку, Натрію, Фосфору, Калію, Кальцію) у біологічних зразках (кров, сироватка, сеча) методом оптико-емісійної індуктивно-зв'язаної плазми та визначені валідаційних характеристик методу а саме: межа детектування, межа кількісного визначення, точність, правильність, збіжність, відтворюваність, селективність, лінійність, робочий діапазон. Встановлено, що даний метод є простим, чутливим практичним та універсальним, що підтверджується даними LOD та LOQ. Метод демонструє хорошу лінійність у діапазоні 1–1000 мкг/л залежно від досліджуваного металу. Метод є селективним і точним. Одержані валідаційні дані задовольняють вимоги Настанови Eurachem.

Ключові слова: мікро-, макроелементи, токсичні елементи, ICP OES, біологічні зразки, валідація.

Вступ

У сучасній практиці діагностики вмісту мікроелементів в організмі тварин прийняті методи їх визначення в крові, сечі, волоссі, слині, зубному дентині та кістках (Dion et al., 2018; Płotka-Wasyłka et al., 2018; Shulyak et al., 2021). Кількісні спектрометричні методи аналізу біосубстратів ускладнюються низьким вмістом елементів а також неоднорідністю структурного і елементного складу біологічної матриці (Zhang et al., 2016; Laur et al., 2020). Проте, сучасні методи дають змогу мінімізувати вплив речовин, які “заважають” та фонових факторів з використанням новітніх методів розкладання біологічних зразків за допомогою мікрохвильової мінералізації закритого типу під тиском, що мінімізує втрати елементів, які є неминучими як при сухому оголенні, так і при кислотній мінералізації біопроб. Використання закритого тиску та високої температури значно пришвидшує реакцію розкладу та дає можливість знизити втрати мікроелементів у вигляді високолетких молекулярних сполук, наприклад це стосується визначення елементів, що утворюють леткі гідриди і галогени, такі як As, B, Cr, Hg, Sb Sn, та Se. Перевагою мікрохвильового розкладання також є мінімізація кількості реагентів і як наслідок – мінімізація можливих забруднень, які можуть бути присутні при використанні реагентів невідповідної чистоти, значно коротший термін розкладання проб, та мінімальна кількість зразка. Крім того, даний вид підготовки проб дає змогу уникнути концентрування проби для визначення певних мікроелементів, які містяться в біосубстратах у наднизьких кількостях (Sharma & Bhattacharya, 2017; Shahid et al., 2018).

Метод оптико-емісійної спектрометрії з індуктивно-зв'язаною плазмою ICP EOS передбачає одночасне багатоелементне кількісне визначення металів в широкому діапазоні, що значно пришвидшує процес рутинних аналізів біологічних зразків. Для компенсації змінного внеску фону, завад та інтерференцій ви-

користується відповідний метод коригування. Оптичний спектр з можливістю аксіального та радіального перегляду дозволяє одночасно визначати велику кількість елементів в діапазоні від 165 до 800 нм (Ipeaiyeda & Ayoade, 2017). Тому для якісного, адекватного встановлення точного діагнозу (отруєння токсичними елементами, мікро-, макроелементозі) важливо мати точний кількісний метод визначення елементів в індикаторних біосубстратах тварин (Burke et al., 2016; Alexander & Rohman, 2019).

Враховуючи це та відсутність офіційного методу визначення елементів у біологічних зразках, виникає необхідність оптимізації та валідації методики визначення токсичних елементів, мікро-, макроелементів у біологічних зразках за допомогою ICP OES.

Мета дослідження

Мета роботи – провести оцінку придатності методу з визначення мікро- та макроелементів у біологічних рідинах за допомогою атомно-емісійної індуктивно-зв'язаної плазми (ICP OES).

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводились у лабораторії атомно-абсорбційної спектрофотометрії науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Для визначення Алюмінію, Стибію, Арсену, Бору, Кадмію, Хрому, Кобальту, Купруму, Феруму, Плюмбуму, Мангану, Молибдену, Селену, Аргентуму, Натрію, Цинку, Калію, Кальцію, Фосфору використовували оптико-емісійний спектрометр (ICP-OES) PlasmaQuant PQ 9000 (Німеччина). Для підготовки зразків та приготування фонових, калібрувальних розчинів використовували ультрачисту азотну кислоту (Merck, Німеччина), сертифіковані багатоелементні стандартні розчи-

ни для атомно-емісійної спектрометрії (Merck, Німеччина) з атестованим вмістом іонів. Розчинником слугувала ультрачиста деіонізована вода, приготована очисною системою Atrium 631 UV (Sartorius, Німеччина). Для мінералізації біологічних зразків використовували систему Milestone Ethnos Easy з автоклавами ротора високого тиску HPR-1000/10S (Milestone, Італія). Для дослідження відбирали проби крові ВРХ, птиці по 1,0 мл.

Результати та їх обговорення

Валідацію розробленого методу проводили для підтвердження того, що за своїми характеристиками метод придатний для конкретного застосування, згідно з ISO/IEC 17025:2019 п. 7.2. про необхідність підтвердження того, що методи відповідають поставленому завданню (табл. 2).

Метод кількісного аналізу валідувався згідно з вимогами Настанови Eurachem “Придатність аналітич-

них методів для конкретного застосування. Настанова для лабораторій з валідації методів та суміжних питань”.

Для мінералізації зразків відбирали об’єм проби згідно з [таблицею 1](#) додавали 5 см³ концентрованої азотної кислоти (HNO₃) та використовували Програму № 2 програмного забезпечення EasyCONTROL з автоклавами ротора високого тиску HPR-1000/10S.

Таблиця 1

Маса наважки для визначення вмісту макро- і мікроелементів у біологічних зразках для мінералізації системою Milestone Ethnos D та автоклавами ротора високого тиску HPR-1000/10S

Вид зразка	Наважка для СВЧ – мінералізації, мл
Кров	0,8
Сироватка крові	0,6
Сеча	0,6

Таблиця 2

Валідаційні характеристики визначення мікро- та макроелементів у біологічних зразках (кров) методом оптико-емісійної спектрометрії з індуктивно зв’язаною плазмою

№	Назва компонента	Масова частка, мкг/л	Внутрішньолабораторна відтворюваність, % (нормативна)	Внутрішньолабораторна відтворюваність, % (фактична)	Точність, %	Межа кількісного визначення, мкг/л
1	Mn	>1,0	10	5,45	98,9	2,0
2	Al	>1,0	10	5,02	98,8	2,0
3	Sb	>1,0	10	5,92	99,6	4,0
4	Cr	>1,0	10	5,10	98,9	2,0
5	Co	>1,0	10	4,9	99,5	2,0
6	Mo	>1,0	10	5,78	98,8	2,0
7	B	>1,0	10	5,80	99,6	10,0
8	Cd	>1,0	10	6,40	98,9	1,0
9	Cu	>1,0	10	4,10	98,8	1,0
10	Pb	>1,0	10	9,7	98,9	1,0
11	Se	>1,0	10	4,5	98,9	1,0
12	Zn	>1,0	10	5,70	98,8	1,0
13	Na	>1,0	10	4,90	98,9	10,0
14	P	>1,0	10	4,6	98,8	10,0
15	Ca	>1,0	10	6,4	98,9	10,0
16	Mg	>1,0	10	6,4	98,9	10,0
17	K	>1,0	10	6,4	98,9	10,0

Валідаційний процес визначення елементного складу біологічних субстратів забезпечили дослідженням 80 зразків крові ВРХ, 40 зразків крові та сироватки птиці та дослідженням сертифікованого референт матеріалу з атестованим вмістом іонів металів (SRM 966 – Toxic Metals in Bovine Blood, NIST, США). Визначалися ключові робочі параметри: межа кількісного визначення, межа детектування, збіжність, відтворюваність, точність, лінійність, специфічність, стабільність. Результати проведених робіт оброблялись відповідно до прийнятих критеріїв (статистична обробка отриманих даних програмою Excel 2013).

Встановлені оптимальні умови ICP: швидкість потоку газу небулайзера (аргону) 0,6 л/хв, витрата газу плазми 12 л/хв, час затримки – 90 с, швидкість подачі зразка – 1,0 мл/хв, потужність – 13000 Вт. Оптиміза-

ція методу дозволила отримати більш чистий сигнал ([рис. 1](#)) та точніший результат, що наведено у [таблиці 2](#).

Робочий діапазон або інтервал – оцінювали перевіркою того, як даний аналітичний метод забезпечує точність, правильність і лінійність при визначенні зразків, які вміщують аналіт на границі інтервалу і всередині його. Визначалась як та ділянка, де результати мають прийнятну невизначеність, результати наведені у [таблиці 3](#). Нижня межа робочого діапазону визначається лімітом кількісного визначення, а верхня – точкою, де рівень зміни реакції на одиницю зміни концентрації є недостатнім, що зазначено на [рисунок 2](#).

Діапазон лінійності може змінюватися залежно від типу матриці та відповідно – може виникнути необхідність у його перевірці для певних типів зразків.

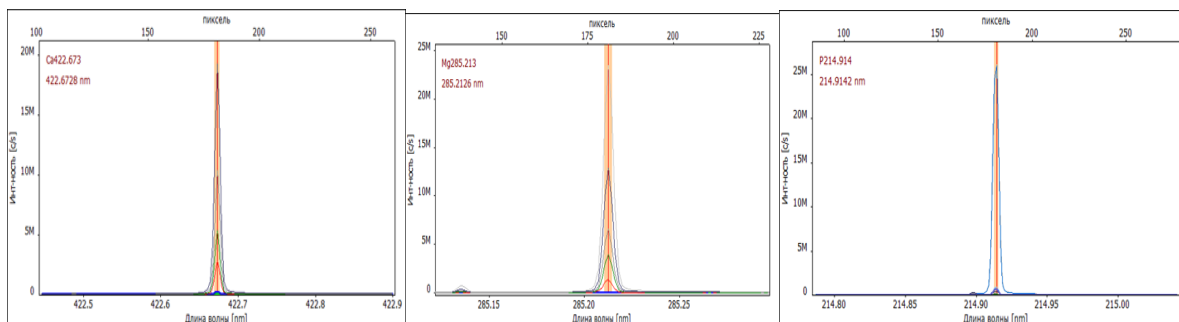


Рис. 1. Інтенсивність сигналу на вибраній хвилі емісії для Кальцію, Магнію, Фосфору

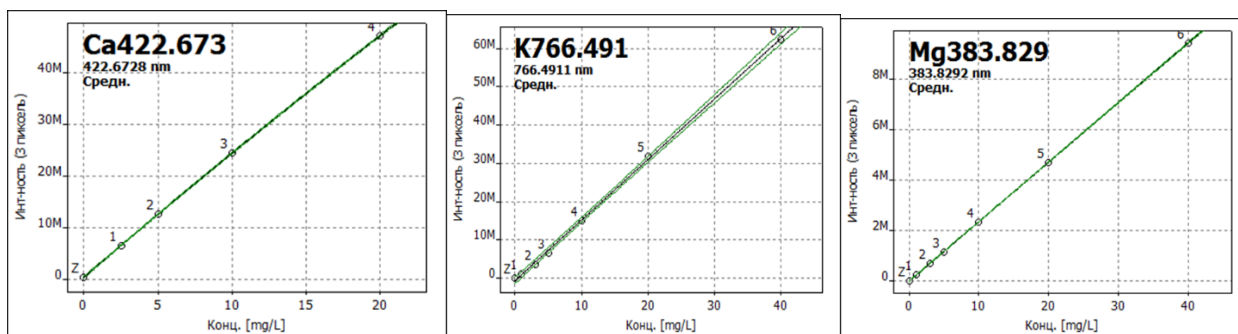


Рис. 2. Лінійність та робочий діапазон для Кальцію, Калію, Магнію

Таблиця 3

Діапазон вимірювань мікро- та макроелементів у біологічних зразках

Елемент	Діапазон концентрацій, мкг/л	Елемент	Діапазон концентрацій, мкг/л
Алюміній	10–200	Бор	500–1000
Арсен	1–20	Кадмій	2–100
Стибій	1–20	Купрум	100–2000
Хром	5–100	Плюмбум	1–20
Кобальт	5–100	Селен	1–20
Манган	5–100	Цинк	50–1000
Молібден	5–100	Натрій	5000–25000
Фосфор	10–80000	Калій	10–80000
Магній	10–20000	Кальцій	10–80000

Лінійність та робочий діапазон дають змогу більш точно оцінювати отримані результати. Лінійність – це здатність показати, що результати тесту є пропорційні концентрації аналіту в зразку в межах даного інтервалу, встановленого для методу. Нахил регресійної лінії і його варіація дає математичну ступінь лінійності. Лінійність оцінювали шляхом візуальної перевірки графіка вимірювальних калібрувальних зразків (рис. 2).

Точність, правильність визначали за допомогою сертифікованого референт-матеріалу, оскільки вона характеризує близькість отриманих результатів до істинного значення і оцінювали за похибкою визначення (табл. 2).

Мінімальна точність кількісного методу, згідно з Директивою Ради 96/23 ЄС щодо застосування аналітичних методів та роз'яснення результатів 2004/657/ЄС, наведена в таблиці 3. Як видно із наведених даних, точність методу цілком відповідає нормативним вимогам.

Збіжність – показник короткотривалих коливань результатів досліджень, критерієм цього показнику є стандартне відхилення паралельних величин.

При вмісті аналітів у зразку в межах 0,001–0,5 мг/кг прийнятне значення RSD не > 20 %. В інших випадках прийнятним вважається значення RSD не > 5.

Відтворюваність визначалась багаторазовим дослідженням зразків в різних умовах, оскільки це характеристика якості результатів вимірювань, яка відображає близькість один до одного результатів повторних спостережень в умовах. Недостатня стабільність досліджуваної речовини або матричних елементів у зразку протягом збереження або аналізу може викликати істотні відхилення в результатах аналізу.

Специфічність методу визначалась тим, наскільки він забезпечує недвозначне виявлення та визначення певного аналіту в суміші без взаємного впливу з боку інших компонентів, які можуть очікуватись у матриці (домішки, близько рівні хімічні сполуки, продукти розпаду, інгредієнти плацебо). Випадки серйозного взаємного впливу не зафіксовані.

Таблиця 4

Регламентовані значення точності

Концентрація аналіту	Регламентоване значення
≤ 1 мкг/кг	- 50 % до + 20 %
>1 мкг/кг до 10 мкг/кг	- 30 % до + 10 %
≥ 10 мкг/кг	- 20 % до + 10 %

Межа детектування або межа виявлення аналітичного методу – статистично визначається як деякий множник, рівний подвоєному двосигмовий критерій) або потроєному трисигмовий критерій) стандартному відхиленню. Дана кількість чисельно дорівнює подвійній величині стандартного відхилення $2S_0$.

Для оцінювання межі кількісного визначення LOQ (Limit of Quantitation) (найнижчий рівень вмісту аналіту в матричній пробі) проводили 10-кратне аналізування тестових проб з низькою концентрацією аналіту.

LOQ обчислювали як концентрацію аналіту, що дорівнює отриманому стандартному відхиленню (s_0') на низьких рівнях концентрації, помноженому на коефіцієнт k . У Рекомендаціях IUPAC прийнято значення за умовчанням $k = 10$, і якщо стандартний відхил є приблизно постійний на низьких концентраціях, цей множник відповідає відносному стандартному відхиленню (RSD), що дорівнює 10 %. Тому важливим критерієм є значення межі кількісного визначення методу для вірної інтерпретації і достовірності результатів аналізу.

Висновки

Сучасні методи діагностики потребують точного, швидкого, одночасного визначення багатьох металів у біологічних середовищах тварин. У такому випадку доцільно використовувати багатоелементні методи аналізу з низькими межами виявлення та широким діапазоном детекції (в концентраціях від мкг до мг).

Отримані під час валідації результати демонструють, що даний метод є швидким, чутливим, точним при використанні його для рутинних досліджень біологічних зразків та має достатні рівні LOD і LOQ. Метод ICP OES визначення металів у біосубстратах є простим у використанні, із застосуванням швидкого та ефективного методу підготовки проб, дає змогу визначати метали в широкому діапазоні, що є важливим при дослідженні мінеральних та есенціальних мікроелементів крові та потребує малої кількості біологічного матеріалу, що є актуальним під час прижиттєвого відбору зразків у тварин. Це дозволяє застосувати метод ICP OES за призначенням та отримувати дані високої точності.

Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

References

- Alexander, D., & Rohman, A. (2019). Analytical method validation of icp-aes for analysis of cadmium, chromium, cuprum, mangan and nickel in milk. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(4), 341–344. DOI: 10.22159/ijap.2019v11i4.29503
- Andersen, K.-J., Wikshåland, Å., Utheim, A., Julshamn, K., & Vik, H. (1986). Determination of silver in biological samples using graphite furnace atomic absorption spectrometry based on Zeman effect background correction and matrix modification. *Clinical Biochemistry*, 19(3), 166–170. DOI: 10.1016/S0009-9120(86)80017-0.
- Burke, F., Hamza, S., Naseem, S., Nawaz-ul-Huda, S., Azam, M., & Khan, I (2016). Impact of Cadmium Polluted Groundwater on Human Health: Winder, Balochistan. *SAGE Open*, 6(1). DOI: 10.1177/2158244016634409.
- Carvalho, R. N. C. S., Brito, G. B., Korn, M. G. A., Teixeira, J. S. R., Dias, F. S., Dantas, A. F., & Teixeira, L. S. G. (2015). Multi-element determination of copper, iron, nickel, manganese, lead and zinc in environmental water samples by ICP OES after solid phase extraction with a C18 cartridge loaded with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Analytical Methods*, 20, 8714–8719. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ay/c5ay01929j>.
- Dion, L. A., Saint-Amour, D., Sauvé, S., Barbeau, B., Mergler, D., & Bouchard, M. F. (2018). Changes in water manganese levels and longitudinal assessment of intellectual function in children exposed through drinking water. *Neurotoxicology*, 64, 118–125. DOI: 10.1016/j.neuro.2017.08.015.
- Ipeayeda, A. R., & Ayoade, A. R. (2017). Flame atomic absorption spectrometric determination of heavy metals in aqueous solution and surface water preceded by co-precipitation procedure with copper(II) 8-hydroxyquinoline. *Applied Water Science*, 7(8), 4449–4459. DOI: 10.1007/s13201-017-0590-9.
- Laur, N., Kinscherf, R., Pomytkin, K., Kaiser, L., Knes, O., & Deigner, H.-P. (2020). ICP-MS trace element analysis in serum and whole blood. *PLoS One*, 15(5), e0233357. DOI: 10.1371/journal.pone.0233357.
- Plotka-Wasyłka, J., Frankowski, M., Simeonov, V., & Polkowska, Z. (2018). Determination of Metals Content in Wine Samples by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Molecules*, 23(11), 2886. DOI: 10.3390/molecules23112886.
- Rahman, S. M., Kippler, M., Tofail, F., Bölte, S., Hamadani, J. D., & Vahter, M. (2017) Manganese in Drinking Water and Cognitive Abilities and Behavior at 10 Years of Age: A Prospective Cohort Study. *Environmental health perspectives*, 125(5), 057003. DOI: 10.1289/EHP631.
- Shahid, M., Niazi, N. K., Dumat, C., Naidu, R., Khalid, S., Rahman, M. M., & Bibi, I. (2018) A meta-analysis of the distribution, sources and health risks of arsenic-contaminated groundwater in Pakistan. *Environ Pollut* 242(Pt A), 307–319. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.06.083.

- Sharma, S., & Bhattacharya, A. (2017). Drinking water contamination and treatment techniques. *Appl Water Sci*, 7, 1043–1067. DOI: 10.1007/s13201-016-0455-7.
- Shulyak, S., Shevchenko, L., Mykhalska, V., Kaminska, O., Gaidei, O., Kovalenko, V., Balatskyi, Y., Kryvenok, M., & Boyarchuk, S. (2021). Quality and safety of tap water in selected regions of Ukraine. *Ukrainian Journal of Ecology*, 11(2), 274–283. DOI: 10.15421/2021_111.
- Wan, A. T., Conyers, R. A., Coombs, C. J., & Masterton, J. P. (1991). Determination of silver in Blood, Urine and Tissues of Volunteers and Burn Patients. *Clin Chem*, 37(10 Pt 1), 1683–1687. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1914165>.
- Zhang, T., Cai, S., Forrest, W. C., Mohr, E., Yang, Q., & Forrest, M. L. (2016). Development and Validation of an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) Method for Quantitative Analysis of Platinum in Plasma, Urine, and Tissues Applied. *Spectroscopy*, 70(9), 1529–1536. DOI: 10.1177/0003702816662607.