

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0121-06

不同粉体葛根 UPLC 指纹图谱建立及对比研究

王 梅¹, 刘妍如^{2*}, 孔馨逸², 江大海², 唐志书^{2*}, 吕 杨², 宋忠兴^{2,3}, 赵 鹏³¹陕西中医药大学附属医院, 咸阳 712000; ²陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协

同创新中心 陕西省创新药物研究中心, 咸阳 712083;

³陕西兴盛德陕西兴盛德药业有限责任公司, 铜川 727031

摘要:本研究分别建立葛根超微粉和细粉的 UPLC 指纹图谱,并对其进行对比研究。采用 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱,以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相,检测波长 254 nm,体积流量 0.2 mL/min,柱温 30 °C,进样量 2 μL,进行梯度洗脱。以 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元为参照物,对 10 批次葛根超微粉及 10 批次细粉进行指纹图谱分析,并进行相似度分析。建立了葛根超微粉及细粉的 UPLC 指纹图谱,标定葛根细粉共有峰 22 个,葛根超微粉共有峰 24 个,并用对照品指认了 6 个色谱峰,方法精密度、重复性及稳定性良好,两者在共有峰上无明显差别,峰面积有较为明显的差别。结果表明该方法稳定准确,建立的 UPLC 指纹图谱能从整体上反映出葛根超微粉及细粉的化学成分信息,为葛根细粉及超微粉的质量标准提供参考。

关键词:葛根;超微粉;葛根素;超高效液相色谱法;指纹图谱;相似性分析

中图分类号:R284.1; Q946.91

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.017

UPLC Fingerprint Study on Ultra-micro and Normal Powder of *Pueraria Radix*

WANG Mei¹, LIU Yan-ru^{2*}, KONG Xin-yi², JANG Da-hai², TANG Zhi-shu^{2*}, LYU Yang², SONG Zhong-xing^{2,3}, ZHAO Peng³¹The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China²Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese

Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi Province Drug Discovery Center of Innovation, Xianyang 712083, China;

³Shaanxi Sciendan Pharmaceutical Co., Ltd, Tongchuan 727031, China;

Abstract: To establish UPLC fingerprint of Ultra-micro and Normal powder of *Pueraria Radix* respectively and compare the fingerprint. The UPLC chromatographic column was Acquity UPLC® BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid water with gradient elution wavelength was 230nm and column temperature was 30 °C with the flow rate of 0.2 mL/min. The fingerprints of 10 batches of Ultra-micro and 10 batches of Normal were analyzed with 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, daidzin, genistin and daidzein the similarity analysis was carried out. The results of methodological study met technical requirements of UPLC fingerprint. The UPLC fingerprints of ultra - micro and normal powder of *Pueraria Radix* had obvious difference in area of common peaks but less differences in number of common peaks. The UPLC method was stable and accurate and could reflect the whole chemical composition information and provide a basis for the establishment of quality standard for Ultra-micro and Normal powder of *Pueraria Radix*.

Key words: *Pueraria Radix*; ultrafine powder; puerarin; Ultra-high performance liquid chromatography; chromatographic fingerprint; similarity analysis

收稿日期:2018-05-11 接受日期:2018-07-25

基金项目:国家自然科学基金项目(81501229);陕西省科技厅“科技新星”培养计划(2017KJXX-71);陕西省科技统筹创新工程计划项目(2015KTZDSF02-05-02);陕西省创新药物研究中心(2017YWZX-01)

*通信作者 Tel: 86-29-38182207; Email: yanzi_2203@aliyun.com, tzs6565@163.com

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.)Ohwi 的干燥根,收载于《中国药典》2015 年版一部,其味甘、辛,性凉,有解肌退热,透疹,生津止渴,升阳止泻,通筋活络,解酒毒^[1]。现代药理作用表明,葛根具有降血压、抗氧化、扩张脑血管,增加脑流量、预

防心律失常、抗肿瘤及诱导细胞分化的作用^[2]，临床应用广泛。葛根所含的化学成分主要是黄酮类化合物，因此采用黄酮类化合物的含量作为葛根质量的评价指标是较为全面的^[3]。通过 HPLC 建立葛根指纹图谱已有大量的文献报道，但单独采用超高效液相色谱（UPLC）法建立葛根的指纹图谱分析方法目前国内还未见报道。超高效液相色谱（UPLC）比高效液相色谱（HPLC）具有更高的分离速度、精确度与灵敏度，可大大的缩短分析时间，相较 LC-MS 更实用，实现指纹图谱的快速获得，提高中药质量的评价效率^[4-11]。

近年来，超微粉碎技术在中药制剂领域应用广泛，与传统粉碎技术相比，其可将中药材粉碎成微米级甚至纳米级，显著提高药材细胞壁的破壁率，药粉颗粒大小分布更均匀、增加表面积，能更快地促进细胞内有效成分的溶出、释放和吸收，提高了中药成分的利用效率，减少浪费^[12,13]。

本实验运用中药指纹图谱技术，利用 UPLC 对 20 个批次的葛根超微粉及细粉进行快速测定，建立了葛根超微粉及细粉的 UPLC 指纹图谱，以期为葛根超微粉及细粉的质量评价和研究开发提供参考依据，为促进其更深度研究开发打下良好的基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

鑫博得高速万能粉碎机 FW-1000AD（天津鑫博得仪器有限公司）；细胞级超微粉碎机（济南天宇专用设备有限公司）；Waters Acquity UPLC H-Class System，配备 Acquity UPLC QSM、Acquity UPLC Sample、Manager FTN、Acquity UPLC PDA Detector 以及 Empower 2 工作站（美国 Waters 公司）；KQ-300DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；十万分之一电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司）。

1.2 试剂和材料

甲醇、乙腈为色谱纯（Honeywell 公司）

大豆昔元（批号：52300050）购自上海安谱实验科技股份有限公司，3'-羟基葛根素（HH148457198）、3'-甲氧基葛根素（HA06010698）购自宝鸡辰光生物有限公司，葛根素（110752-200410）、染料木昔（批号：111709-201702）、大豆昔（批号：111738-201603）购自中国食品药品检定研究院，质量分数均大于 98%。

葛根药材（产地广西，批号：20170601）购自陕西兴盛德药业有限责任公司，经陕西中医药大学陕西省中药资源产业化协同创新中心张琳教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液的制备

分别取 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆昔、大豆昔元、染料木昔对照品适量，精密称定，加入 1:1 的甲醇水制成浓度分别为 28.19、28.40、29.52、30.90、26.10、30.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准工作储备溶液，于 4 °C 保存。

2.1.2 供试品溶液的制备

取葛根药材超微粉及细粉各 10 批，精密称定各粉末 0.5 g，加入沸水搅拌均匀，超声（300 W, 50 Hz）处理 10 min，过 0.22 μm 水系微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.2 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)；流动相 A 相为 0.1% 磷酸水溶液，B 相为乙腈，梯度洗脱条件为：0 ~ 10 min, 10% ~ 100% B；10 ~ 13 min, 100% ~ 10% B；13 ~ 15 min, 10% B；流速 0.2 mL/min；进样量为 2 μL ；柱温 30 °C；检测波长 254 nm。

2.3 方法学考察

2.3.1 仪器精密度

取 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆昔、染料木昔、大豆昔元的混合对照品溶液重复进样 6 次，测得 6 种黄酮类各成分的峰面积相对标准偏差（RSD）为 0.09% ~ 0.70%，保留时间相对标准偏差（RSD）为 0.24% ~ 1.00%，表明仪器精密度良好。

2.3.2 方法精密度

日内精密度

取同批的供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，进样量为 2 μL ，测得各成分峰面积的标准偏差（RSD）为 0.16% ~ 1.95%，保留时间的相对标准偏差（RSD）为 0.25% ~ 1.70%。表明日内精密度良好。

日间精密度

取同批的供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件，

每天连续进样 6 次,进样 3 天,进样量为 2 μL ,测得各成分峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.01% ~ 1.83%。保留时间的相对标准偏差(RSD)为 0.54% ~ 1.81%,表明日间精密度良好。

2.3.3 稳定性试验

精密称取样品,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,室温下放置,并按“2.2”项下色谱条件于 0、4、8、12、18、24 h 进样测定。测得各成分峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.48% ~ 1.89%。保留时间的相对标准偏差(RSD)为 0.36% ~ 1.64%。表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验

精密称取样品 6 份,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2”项下色谱条件进样分析并记录峰面积。测得得 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元各峰峰面积的重复性相对标准偏差(RSD)为 0.06% ~ 2.64%。表明重复性良好。

2.4 样品的测定

取葛根超微粉及细粉各 10 批供试品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行测定,记录 UPLC 图谱,见图 2~3。

2.5 UPLC 指纹图谱的建立

2.5.1 参比峰的选择

在 20 批次样品指纹图谱中,葛根素分离度良好,峰位较为居中,且峰面积较大,并且所有样品共有,所以确定葛根素为参比峰。

2.5.2 指纹图谱数据的采集

分别取不同粉体的葛根供试品,按照 2.2 项下的色谱条件得到细粉和超微粉的指纹图谱。以葛根素为参照峰,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)分别对 20 批葛根超微粉及细粉样品的 UPLC 指纹图谱进行采集及分析,分别对他们的共有峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。

2.5.3 共有峰的标定

对 20 批次样品的图谱进行分析比较,计算不同批次的葛根粉供试品色谱图共有峰占总面积为 90% 以上,符合指纹图谱的要求。

2.5.4 指纹图谱共有模式的建立及相似度评价

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)分别对各葛根粉进行相似度分析。以葛根超微粉为例,以葛根素为参照峰,以 S1 为参照图谱,经过多点校正,自动匹配,采用中位数法生成对照谱,见

图 2~3。标示了葛根细粉指纹图谱中共有峰 22 个,超微粉指纹图谱中共有峰 24 个(去除溶剂峰),其中 10 号峰为葛根素,见图 1。

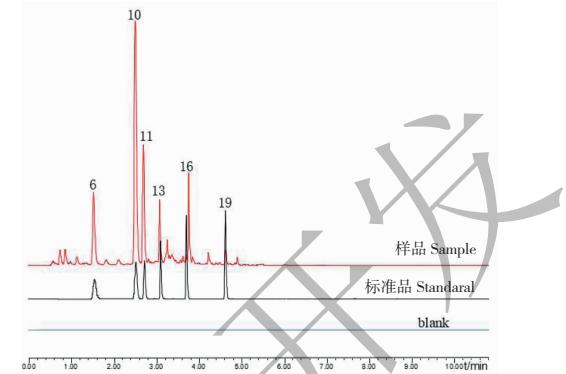


图 1 葛根超微粉的共有模式图谱

Fig. 1 Total pattern diagram of *Pueraria Radix* ultra-micro powder

6. 3'-羟基葛根素, 10. 葛根素, 11. 3'-甲氧基葛根素, 13. 大豆苷, 16. 染料木苷, 19. 大豆苷元
6. 3'-hydroxy puerarin, 10. puerarin, 11. 3'-methoxy puerarin, 13. daidzin, 16. daidzein, 19. daidzein

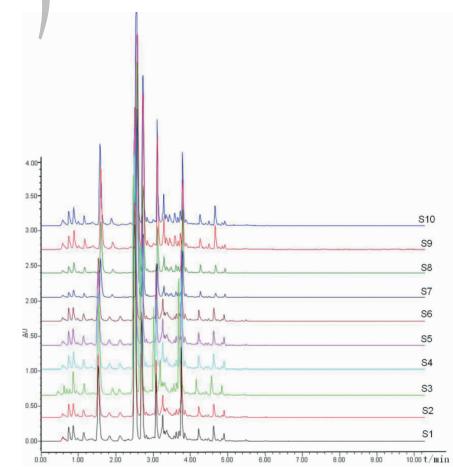


图 2 10 批葛根细粉的 UPLC 指纹图谱

Fig. 2 UPLC fingerprints for 10 batches of *Pueraria Radix* Normal powder

由葛根细粉及超微粉的指纹图谱可以从整体上反应出其化学成分信息,可以为葛根超微粉及细粉质量标准提供参考。此外,两种不同粉体葛根在共有峰并无明显差别,但在共有峰的峰面积上,超微粉的共有峰峰面积要大于细粉,见表 1。

2.5.5 相似度评价

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)分别对葛根细粉和超微粉指纹图谱进行相似度分析,结果如表 1~2 所示,葛根细粉及超

微粉与对照图谱的相似度均大于 0.90, 符合指纹图谱的要求。

表 1 不同批次葛根细粉、超微粉共有峰峰面积均值及相应比值

Table 1 The peak area average and corresponding ratio of different batches of *Pueraria Radix* ultra-micro and normal powder

峰号 No.	S1	S2	S2/S1	峰号 No.	S1	S2	S2/S1
1	263.93	349.81	1.32	13	176.48	1987.81	11.26
2	413.43	594.04	1.43	14	525.60	776.04	1.47
3	642.61	964.29	1.50	15	179.42	254.57	1.41
4	164.79	238.59	1.44	16	553.14	696.34	1.25
5	214.81	488.87	2.27	17	248.68	387.35	1.55
6	2823.47	4544.53	1.60	18	13.22	23.57	1.78
7	268.95	507.43	1.88	19	5.48	15.94	2.90
8	10574.03	12711.48	1.20	20	13.76	163.02	11.84
9	4854.10	6759.25	1.39	21	2.82	6.27	2.21
10	1537.85	3044.03	1.97	22	23.89	188.00	7.86
11	543.73	848.51	1.56	23	-	104.22	-
12	2669.57	3863.26	1.44	24	-	17.91	-

注:S1 为 10 批葛根细粉各共有峰峰面积均值;S2 为 10 批葛根超微粉各共有峰峰面积均值。

Note:S1 indicated the mean peak and peak area of 10 batches of pueraria powder;S2 indicated the average peak and peak area of 10 batches of pueraria ultrafine powder.

表 2 葛根细粉指纹图谱相似度评价

Table 2 Fingerprint similarity of *Pueraria Radix* Normal powder

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1	0.993	0.995	0.991	0.989	0.99	0.987	0.991	0.981	0.987	0.991
S2	0.993	1	1	0.997	0.996	0.996	0.995	0.995	0.994	0.995	0.997
S3	0.995	1	1	0.997	0.996	0.995	0.994	0.995	0.992	0.994	0.997
S4	0.991	0.997	0.997	1	0.998	0.998	0.999	0.999	0.996	0.999	1
S5	0.989	0.996	0.996	0.998	1	0.998	0.998	0.997	0.997	0.998	0.999
S6	0.99	0.996	0.995	0.998	0.998	1	0.997	0.999	0.996	0.997	0.999
S7	0.987	0.995	0.994	0.999	0.998	0.997	1	0.998	0.997	1	0.999
S8	0.991	0.995	0.995	0.999	0.997	0.999	0.998	1	0.994	0.998	0.999
S9	0.981	0.994	0.992	0.996	0.997	0.996	0.997	0.994	1	0.997	0.996
S10	0.987	0.995	0.994	0.999	0.998	0.997	1	0.998	0.997	1	0.999
R	0.991	0.997	0.997	1	0.999	0.999	0.999	0.999	0.996	0.999	1

注:R-对照指纹图谱。

R-control fingerprint.

表 3 葛根超微粉指纹图谱相似度评价

Table 3 Fingerprint similarity of *Pueraria Radix* ultra-micro powder

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1	0.903	1	1	0.995	0.976	0.978	0.957	0.96	0.999	0.989
S2	0.903	1	0.903	0.904	0.895	0.915	0.919	0.921	0.92	0.904	0.918
S3	1	0.903	1	1	0.994	0.975	0.977	0.957	0.96	0.999	0.989
S4	1	0.904	1	1	0.995	0.977	0.978	0.958	0.961	0.999	0.989
S5	0.995	0.895	0.994	0.995	1	0.979	0.978	0.95	0.955	0.996	0.985

续表3(Continued Tab. 3)

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S6	0.976	0.915	0.975	0.977	0.979	1	0.999	0.98	0.984	0.98	0.992
S7	0.978	0.919	0.977	0.978	0.978	0.999	1	0.986	0.988	0.981	0.993
S8	0.957	0.921	0.957	0.958	0.95	0.98	0.986	1	0.999	0.956	0.977
S9	0.96	0.92	0.96	0.961	0.955	0.984	0.988	0.999	1	0.96	0.98
S10	0.999	0.904	0.999	0.999	0.996	0.98	0.981	0.956	0.96	1	0.99
R	0.989	0.918	0.989	0.989	0.985	0.992	0.993	0.977	0.98	0.99	1

注:R-对照指纹图谱。

Note: R-control fingerprint.

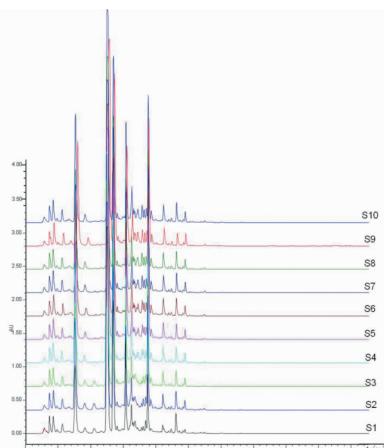


图3 10批葛根超微粉的UPLC指纹图谱

Fig. 3 UPLC fingerprints for 10 batches of *Pueraria Radix* ultra-micro powder

3 讨论

3.1 样品提取条件的考察

本实验对提取溶剂进行了考察,比较了水、甲醇、乙醇作为提取溶剂,结果表明,虽然醇提样品中色谱峰个数较多,但水提样品中葛根总黄酮含量较高,且无溶剂效应,故采用纯水作为提取溶剂。故采用了加入沸水冲搅,超声处理10 min的方法进行提取,该方法更接近日常对超微粉的服用方式。

3.2 色谱条件的选择

本实验使用Waters的PDA检测器进行紫外区全波长扫描,结果表明在254 nm波长下,色谱图基线噪音低,特征峰响应较高,黄酮类成分色谱图信息较为完全,因此选用254 nm作为本实验的检测波长。实验还考察了0.1%甲酸水-乙腈、0.05%甲酸水-乙腈、0.1%磷酸水-乙腈、0.05%磷酸水-乙腈4个流动相系统,结果表明采用0.1%磷酸水-乙腈流动相系统,各峰分离度较好,且基线平稳,因此最终选择采用0.1%磷酸水-乙腈系统作为流动相系统。

本实验通过对葛根两种粉体进行UPLC指纹图谱研究,对共有峰进行指认,建立其共有模式,为葛根质量标准提供参考。同时葛根超微粉的提取效率要优于葛根细粉,说明葛根经过超微粉碎之后,粉体粒径减小,比表面积增大,与提取溶媒的接触面积增加,相同的提取时间内提取效率增大,有效成分溶出量增加,这也反映了超微粉碎技术在传统中药饮片技术中的应用前景。

4 结论

UPLC在指纹图谱的建立中,不仅能够大大缩短检测时间,而且因色谱柱填料粒径小的自身特点而具有良好的分离度,这为中药材的指纹图谱建立提供了更快捷的方法。

本实验采用UPLC,通过对提取溶剂、流动相及检测波长等的选择,建立了20各批次葛根超微粉及细粉的指纹图谱,这对葛根超微粉及细粉的质量控制与产品开发利用均具有重要的意义。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the people's republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:11.
- 2 Luo CF, Yuan M, Chen MS, et al. Metabolites of puerarin identified by liquid chromatography tandem mass spectrometry: similar metabolic profiles in liver and intestine of rats [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878:363-370.
- 3 Loutchanwoot P, Vortherms T, Jarry H. Evaluation of in vivo estrogenic potency of natural estrogen-active chemical, puerarin, on pituitary function in gonadectomized female rats [J]. *Life Sci*, 2016, 165:75-82.
- 4 Deng SD(邓少东). Comparison on UPLC and HPLC fingerprints of flavonoids in *Citri Grandis Exocarpium* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2013, 44:1195-1198.

- 5 Cheng JY(程京艳). Study on pharmacodynamic components based on Pueraria lobata [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学), 20011.
- 6 Li Q(李强). Progress in fingerprint technology on Chinese materia medica and prospect of its future development [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2013, 44:3095-3104.
- 7 Zhu M(祝明), Chen BL(陈碧莲), Shi SM(石上梅). Application of fingerprint technology on traditional chinese medicine in Chinese pharmacopoeia [J]. *Chin J Mod App Phar*(中国现代应用药学), 2016, 33:611-614.
- 8 Xiao HH(肖洪贺), Yan Y(闫艳), Le XY(乐心逸). HPLC fingerprints of Gegen Tang and multi-target component Quantitative analysis[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2015, 15:47-52.
- 9 Wang D(王迪). Quantitative determination of multiple characteristic components in Gegen Qinlian Pills by QAMS method[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48:4453-4459.
- 10 Wu F(吴锋) . Simultaneous determination of danshensu, protocatechuic aldehyde, and puerarin in Xinkeshu Pills by HPLC[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2012, 43: 1770-1772.
- 11 Luo J, Fan X, Cui S, et al. UPLC fingerprint of Anemarrhenae Rhizoma and its hierarchical cluster analysis[J]. *Chin J Mod Applied Pharmacy*, 2013.
- 12 Liang ZC(梁兆昌), Chu HB(褚洪标), Xiao L(肖琳). Physicochemical properties and *in vitro* dissolution behavior of active ingredients in ultrafine powder of Eucommia ulmoides[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2015, 46: 1609-1614.
- 13 Wang MT(王觅堂), Li M(李梅), Liu ZG(柳召刚). Agglomeration mechanism, characterization and elimination of ultrafine powders[J]. *Chin Pow Sci and Tech*(中国粉体技术), 2008, 14(3):46-51.

(上接第 48 页)

- 12 Wu JQ(吴俊清), Zhu LY(朱丽云), Yin J(尹洁), et al. Seasonal variations and pharmaceutical prospects in chemical compositions of *Myrica rubra* leaves volatile oils [J]. *Chin Pharm Anal*(药物分析杂志), 2015:35(7):19-26.
- 13 Liang ZY(梁振益), Luo SX(罗盛旭), Feng YH(冯玉红). Study of chemical constituents of the essential oil from *Camellia sinensis*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2003, 15:423-425.
- 14 GB 1886. 270-2016, Food safety national standards(食品安全国家标准), food additives, tea tree oil(*Melaleuca alternifolia*) [S]. NBeijing: ational Health and Family Planning Commission of PRC, 2017.
- 15 Wang Y(王懿). Studies of pharmacological action of the essential oil of *Melaleuca Alternifolia* (tea Tree Oil) [D]. Chongqing: Third Military Medical University(第三军医大学), 2005.
- 16 Zhong ZS(钟振声), Yuan YQ(袁裕泉), Fan LF(樊丽妃). Studies on the antibacterial composition diversity of introduced *melaleuca alternifolia*oil [J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*(中山大学学报), 2012, 51:7-13.
- 17 PH Hart, C Brand, CF Carson, et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes [J]. *Inflamm Res*, 2000, 49: 619-626.
- 18 A Garozzo, R Timpanaro, B Bisignano, et al. *In vitro* antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2009, 49:806-808.