

中药金樱子叶的化学成分研究

吴建林¹, 王平², 高鹏¹, 曾娜³, 刘香芳³, 王书一³, 沈阳³, 徐超斗⁴ (1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 北京同仁堂药材公司, 北京 100035; 3. 上海市儿童医院, 上海 201203; 4. 总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100071)

[摘要] 目的 研究金樱子 *Rosa Laevigata* Michx. 嫩叶的化学成分。方法 运用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱(Sephadex LH-20)以及半制备高效液相色谱等多种现代色谱技术进行分离纯化, 根据理化性质和波谱分析鉴定化合物结构。结果 从金樱子叶的70%乙醇提取物乙酸乙酯部位分离鉴定得到12个化合物, 分别为儿茶素(1)、槲皮素(2)、柚皮素(3)、山柰酚(4)、没食子酸乙酯(5)、对羟基肉桂酸乙酯(6)、 ω -hydroxypropioquaiacone(7)、3,4-二羟基苯乙醇(8)、邻羟基苯甲酸(9)、萘葶亭(10)、乙基- α -D-呋喃阿拉伯糖苷(11)、甲基-O- β -D-葡萄糖苷(12)。结论 化合物11为首次从蔷薇属植物中分离得到, 化合物3,5~9为首次从金樱子叶中分离得到。

[关键词] 金樱子叶; 化学成分; 提取分离; 结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)04-0275-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.04.008

Studies on the chemical constituents in leaves of *Rosa Laevigata* Michx

WU Jian-lin¹, WANG Ping², GAO Peng¹, ZENG Na³, LIU Xiang-fang³, WANG Sui-yi³, SHEN Yang³, XU Chao-dou⁴ (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Beijing Tongrentang Herbal Medicine Company, Beijing 100035, China; 3. Shanghai Children's Hospital, Shanghai 200040, China; 4. Institute For Drug and Instrument Control of PLA, Beijing 100071 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the chemical constituents from leaves of *Rosa Laevigata* Michx. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 and semi-preparative RP-HPLC. Their structures were identified by spectral data together with physicochemical analysis. **Results** Twelve known compounds were isolated and identified as catechin (1), quercetin (2), naringenin (3), kaempferol (4), ethyl gallate (5), p-hydroxyl ethyl cinnamate (6), ω -hydroxypropioquaiacone (7), hydroxytyrosol (8), o-hydroxybenzoic acid (9), scopoletin (10), ethyl α -D-arabinofuranoside (11), methyl β -D-glucopyranoside (12). **Conclusion** Compound 11 was isolated from genus *Rosa* for the first time, compounds 3, 5~9 were isolated from leaves of *Rosa Laevigata* Michx for the first time.

[Key words] Leaves of *Rosa Laevigata* Michx; chemical constituents; isolation; structure identification

金樱子叶为蔷薇科蔷薇属植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的嫩叶, 性平味辛, 主治痈肿、溃疡、金疮、汤火伤等。《闽东本草》中记载“治汤火伤: 金樱子叶焙干为末, 调麻油涂患处, 欲愈时加入鳖甲末。”民间常用此法治疗烧烫伤。文献报道金樱子叶70%乙醇提取物能明显促进SD大鼠深II度烫伤创面愈合, 并从中分离出一系列三萜类化合物^[1]。为进一步探索金樱子叶治疗烧烫伤的活性成分, 本研究对采自安徽黄山的金樱子叶进行了系统的化学成分分析, 从中分离鉴定得到12个化合物, 分别为儿茶素(1)、槲皮素(2)、柚皮素(3)、山柰酚(4)、没食子酸乙酯(5)、对羟基肉桂酸乙酯(6)、 ω -hydroxypropioquaiacone(7)、3,4-二羟基苯乙醇(8)、

邻羟基苯甲酸(9)、萘葶亭(10)、乙基- α -D-呋喃阿拉伯糖苷(11)、甲基-O- β -D-葡萄糖苷(12)。化合物11为首次从蔷薇属植物中分离得到, 化合物3,5~9为首次从金樱子叶中分离得到。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂 SGW X-4 显微熔点仪(温度计未校正, 上海精密科学仪器有限公司); MAT-212 质谱仪(ES-MS); Q-Tof-micro 质谱仪(ESI-MS); Bruker AC-400, AC-500 型核磁共振仪; JY6001 电子天平(上海恒平科学仪器有限公司); BSZ-100 部分收集器(上海青浦沪西仪器厂); WFH-201B 紫外投射反射仪(上海精科实业有限公司); 柱色谱硅胶(200~300目和300~400目), HSGF₂₅₄ 硅胶薄层层析硅胶板(20 cm × 20 cm), 均为烟台市芝罘黄务硅胶开发试验设计厂; Sephadex LH-20(安发玛西亚生物技术

[作者简介] 吴建林(1976-), 男, 中医学博士。

[通讯作者] 沈阳. E-mail: shenyang@medmail.com.cn; 徐超斗. E-mail: leisstar@126.com.

(上海)有限公司, Merck 公司); HPLC: 仪器 Waters 1525 泵, PDA 2996 检测器 (Waters 公司); 反相柱 (SunFire Prep C₁₈ 250 × 10 mm, 5 μm)。

1.2 材料 药材经第二军医大学药学院生药教研室李红方老师鉴定为金樱子 *Rosa Laevigata* Michx. 的嫩叶。

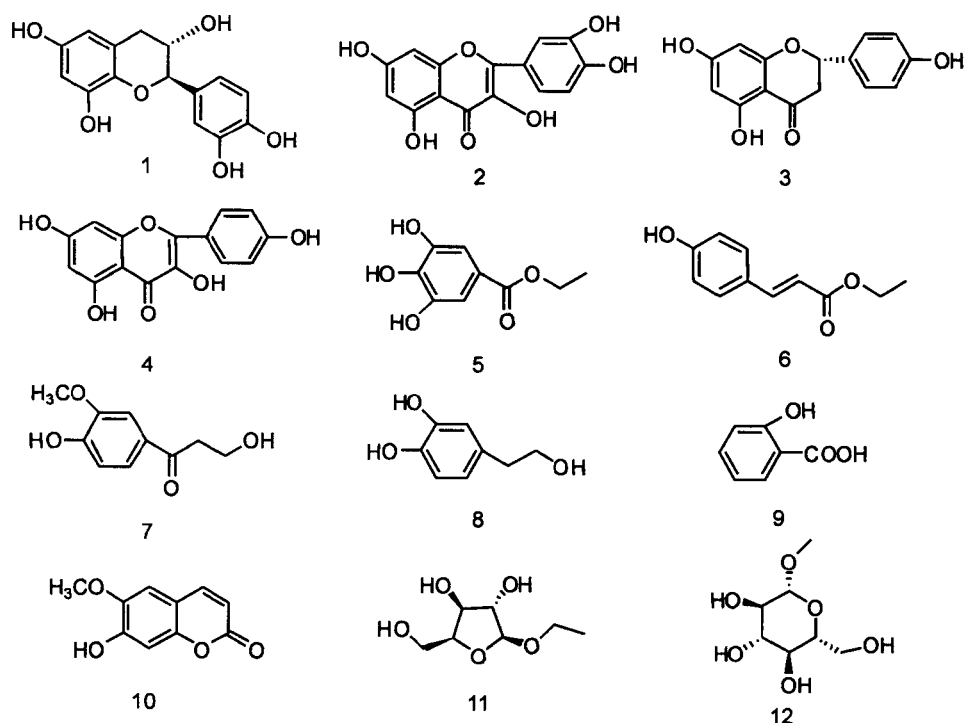


图1 化合物1~12的结构

1.3 提取与分离 取金樱子干燥嫩叶(10 kg), 用70%乙醇水溶液渗滤提取10 d, 减压浓缩乙醇提取液得到水溶液2 kg。用水混悬后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等体积萃取, 萃取液浓缩分别得到A(35 g), B(100 g), C(65 g)三部分。B部分经硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 得到6个组分(Fr. 1~Fr. 6)。Fr. 2再经凝胶柱色谱、硅胶柱色谱和半制备高效液相等色谱技术反复分离, 得到化合物2(20 mg), 3(20 mg), 4(80 mg), 5(20 mg), 6(20 mg), 7(20 mg), 9(20 mg), 10(10 mg), 11(15 mg)。Fr. 4再经凝胶柱色谱、硅胶柱色谱、薄层制备和重结晶等技术反复分离, 得到化合物1(200 mg), 8(40 mg), 12(15 mg)。

2 结构鉴定

2.1 化合物1 白色无定型粉末(甲醇), mp: 94~95 °C。12%硫酸香草醛显色为鲜艳的红色。ESI-MS给出准分子离子峰 m/z : 313 $[M + Na]^+$ 。¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD): δ_{ppm}: 6.83(1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.76(1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.72(1H, d, $J = 8.1, 1.8$ Hz, H-6'), 5.92(1H, d, $J = 2.28$ Hz, H-6), 5.85(1H, d, $J = 2.27$ Hz, H-

8), 4.56(1H, d, $J = 7.49$ Hz, H-2), 3.98(1H, m, H-3), 2.77(1H, dd, $J = 5.44, 16.1$ Hz, H-4a), 2.50(1H, dd, $J = 8.13, 16.1$ Hz, H-4b)。¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD): δ_{ppm}: 83.1(C-2), 69.1(C-3), 28.8(C-4), 158.1(C-5), 96.6(C-6), 157.8(C-7), 95.8(C-8), 157.2(C-9), 101.1(C-10), 132.5(C-1'), 116.4(C-2'), 146.5(C-3', 4'), 115.5(C-5'), 120.3(C-6')。以上光谱数据与文献报道^[2]儿茶素的数据基本一致, 故鉴定化合物1为儿茶素。

2.2 化合物2 黄色无定型粉末(甲醇), mp: 298~299 °C。ESI-MS给出准分子离子峰 m/z : 301 $[M - H]^+$ 。¹H-NMR(500 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 13.40(1H, br. s, 5-OH), 12.13(3H, br. s, 7, 3, 3', 4'-OH), 8.69(1H, s, H-2'), 8.19(1H, d, $J = 7$ Hz, H-6'), 7.46(1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.83(1H, s, H-8), 6.79(1H, s, H-6)。¹³C-NMR(125 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 147.8(C-2), 138.0(C-3), 177.4(C-4), 157.5(C-5), 99.3(C-6), 165.6(C-7), 94.4(C-8), 162.5(C-9), 104.6(C-10), 121.1(C-1', 6'), 147.2(C-3'), 116.8(C-2', 5')。以上光谱数据与文献报道^[3]槲皮素的数据基本一致, 故鉴定化合物2为槲皮素。

2.3 化合物3 白色无定型粉末(甲醇), mp: 246 ~ 249 °C。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 271 [M - H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 7.61 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 7.29 (2H, d, *J* = 9 Hz, H-3', 5'), 6.56 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-8), 6.47 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-6), 5.56 (1H, dd, *J* = 3, 13 Hz, H-2), 3.35 (1H, dd, *J* = 13, 17 Hz, H-3b), 2.95 (1H, dd, *J* = 3, 17 Hz, H-3a)。¹³C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 79.8 (C-2), 43.5 (C-3), 196.5 (C-4), 165.3 (C-5), 97.4 (C-6), 169.0 (C-7), 96.4 (C-8), 164.2 (C-9), 102.9 (C-10), 129.9 (C-1'), 128.9 (C-2', 6'), 159.7 (C-4'), 116.6 (C-3', 5')。以上光谱数据与文献报道^[4]柚皮素的数据基本一致,故鉴定化合物3为柚皮素。

2.4 化合物4 黄色无定型粉末(甲醇), mp: 294 ~ 296 °C。¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 13.4 (1H, br. s, 5-OH), 12.5 (2H, br. s, 7, 4'-OH), 8.63 (2H, d, *J* = 8.74 Hz, H-2', 6'), 7.38 (2H, d, *J* = 8.74 Hz, H-3', 5'), 6.92 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-8), 6.83 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-6)。¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 147.6 (C-2), 137.9 (C-3), 177.5 (C-4), 162.6 (C-5), 99.4 (C-6), 165.7 (C-7), 94.5 (C-8), 160.8 (C-9), 104.6 (C-10), 123.1 (C-1'), 157.6 (C-4'), 130.6 (C-2', 6'), 116.5 (C-3', 5')。以上光谱数据与文献报道^[5]山柰酚的数据基本一致,故鉴定化合物4为山柰酚。

2.5 化合物5 无色针晶(甲醇), mp: 153 ~ 155 °C。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 221 [M + Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 7.92 (2H, s, H-2, 6), 4.34 (2H, q, *J* = 7 Hz, H-2'), 1.25 (3H, t, *J* = 7 Hz, H-3')。¹³C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 121.6 (C-1), 110.3 (C-2, 6), 141.2 (C-4), 147.8 (C-3, 5), 167.4 (C-1', C = O), 60.5 (C-2'), 14.5 (C-3')。以上光谱数据与文献报道^[6]没食子酸乙酯的数据基本一致,故鉴定化合物5为没食子酸乙酯。

2.6 化合物6 无色针晶(甲醇)。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 215 [M + Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 8.02 (1H, d, *J* = 16 Hz, H-7), 7.68 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2, 6), 7.24 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3, 5), 6.67 (1H, d, *J* = 16 Hz, H-8), 4.34 (2H, q, *J* = 7 Hz, H-1'), 1.29 (3H, t, *J* = 7 Hz, H-2')。¹³C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 126.2 (C-1), 130.8 (C-2, 6), 117.0 (C-3, 5), 161.6 (C-4), 145.2 (C-7), 115.4 (C-8), 167.5 (C-9), 60.3 (C-1'), 14.6 (C-2')。以上光谱数据与文献

报道^[7]对羟基肉桂酸乙酯的数据基本一致,故鉴定化合物6为对羟基肉桂酸乙酯。

2.7 化合物7 无色粘稠状物质(甲醇)。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 219 [M + Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ_{ppm}: 7.55 (1H, dd, *J* = 2, 10 Hz, H-6'), 7.52 (1H, s, H-2'), 6.85 (1H, d, *J* = 10 Hz, H-5'), 3.93 (2H, t, *J* = 5 Hz, H-3), 3.14 (2H, t, *J* = 5 Hz, H-2), 3.88 (3H, s, OMe)。在 NOESY 谱中,可观察到 δ_H 3.88 (OMe) 与 7.52 (1H, s, H-2') 有相关, 6.85 (1H, d, *J* = 10 Hz, H-5') 与 7.55 (1H, dd, *J* = 5, 10 Hz, H-6') 有相关,推断甲氧基是在 3'位上取代。¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_{ppm}: 200.0 (C-1), 41.9 (C-2), 59.2 (C-3), 130.9 (C-1'), 112.1 (C-2'), 153.6 (C-3'), 149.3 (C-4'), 116.1 (C-5'), 125.0 (C-6'), 56.7 (OMe)。以上光谱数据与文献报道^[8]ω-Hydroxypropioquaiacone 的数据基本一致,故鉴定化合物7为 ω-hydroxypropioquaiacone。

2.8 化合物8 白色无定型粉末(甲醇)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_{ppm}: 6.67 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-5), 6.64 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2), 6.52 (1H, dd, *J* = 8, 2 Hz, H-6), 3.67 (2H, t, *J* = 7 Hz, H-8), 2.66 (2H, t, *J* = 7 Hz, H-7)。¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_{ppm}: 132.1 (C-1), 116.6 (C-2), 146.4 (C-3), 144.9 (C-4), 117.4 (C-5), 121.5 (C-6), 39.9 (C-7), 64.8 (C-8)。以上光谱数据与文献报道^[9]3,4-二羟基苯乙醇的数据基本一致,故鉴定化合物8为3,4-二羟基苯乙醇。

2.9 化合物9 黄色针晶(甲醇), mp: 161 ~ 162 °C。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 137.0 [M - H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_{ppm}: 10.3 (1H, br. s), 7.95 (1H, dd, *J* = 1.4, 7.9 Hz, H-6), 7.53 (1H, m, H-4), 7.03 (1H, dd, *J* = 0.49, 8.4 Hz, H-5), 6.94 (1H, m, H-3)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_{ppm}: 111.3 (C-1), 162.2 (C-2), 117.8 (C-3), 137.0 (C-4), 119.6 (C-5), 130.9 (C-6), 174.9 (C = O)。以上光谱数据与文献报道^[10]邻羟基苯甲酸的数据基本一致,故鉴定化合物9为邻羟基苯甲酸。

2.10 化合物10 黄色晶体(甲醇), mp: 203 ~ 204 °C。紫外灯下显强烈蓝色荧光。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 191 [M - H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 6.38 (1H, d, *J* = 10 Hz, H-3), 7.77 (1H, d, *J* = 10 Hz, H-4), 7.13 (1H, s, H-5), 7.20 (1H, s, H-8), 3.85 (OMe)。在 NOESY 谱中,可观察到 δ_H 3.85 (OMe) 与 7.13 (1H, s, H-5) 有相关, 7.13 (1H, s, H-5) 与 7.77 (1H, d, *J* = 10 Hz, H-4) 有相关,推断甲氧基取代在 6 位上。¹³C-

NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅): δ_{ppm}: 161.6 (C-2), 112.5 (C-3), 144.2 (C-4), 109.7 (C-5), 151.2 (C-6), 146.4 (C-7), 104.2 (C-8), 153.1 (C-9), 111.3 (C-10)。以上光谱数据与文献报道^[11] 莨菪亭的数据基本一致,故鉴定化合物 10 为莨菪亭。

2.11 化合物 11 无色油状物(甲醇), Molish 反应呈阳性。ESI-MS (*m/z*): 201 [M + Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ_{ppm}: 4.86 (1H, s, H-1), 1.20 (3H, t, *J* = 5 Hz, H-7)。¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_{ppm}: 109.5 (C-1), 85.5 (C-2), 83.8 (C-3), 78.9 (C-4), 64.5 (C-5), 63.3 (C-6), 15.7 (C-7)。以上光谱数据与文献报道^[12] 乙基 α-D-呋喃阿拉伯糖苷的数据基本一致,故鉴定化合物 11 为乙基 α-D-呋喃阿拉伯糖苷。

2.12 化合物 12 无色方晶(甲醇), mp: 106 ~ 108 °C, Molish 反应呈阳性。ESI-MS (*m/z*): 217 [M + Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ_{ppm}: 4.02 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1), 3.37 (OMe)。¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ_{ppm}: 103.9 (C-1), 73.4 (C-2), 76.7 (C-3), 70.1 (C-4), 76.8 (C-5), 61.1 (C-6), 56.0 (OMe)。以上光谱数据与文献报道^[13] 甲基-O-β-D-葡萄糖苷的数据基本一致,故鉴定化合物 12 为甲基-O-β-D-葡萄糖苷。

3 讨论

金樱子叶作为一种治疗烧烫伤的草药,在民间广泛应用。但迄今为止,对金樱子叶的化学成分研究报道较少。作者对金樱子叶 70% 乙醇提取物进行了化学成分的分离,鉴定了 12 个化合物。化合物 11 为首次从蔷薇属植物中分离得到,化合物 3、5~9 为首次从金樱子叶中分离得到。化合物 1~9 为多酚类化合物,文献报道^[14] 植物多酚对多种细菌、真菌、酵母菌都有明显的抑制作用,这可能为金樱子叶治疗烧烫伤提供了作用依据。

【参考文献】

- [1] Zeng N, Shen Y, Li LZ, *et al.* The anti-inflammatory triterpenes from the leaves of *Rosa laevigata* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74:732.
- [2] Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. 7-O-galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloyl p rocyanid in B-3 from *Sanguisorba officinalis* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(11): 2575.
- [3] Ternai B, Markham KR. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-I flavones and flavonols [J]. *Tetrahedron*, 1976, 32(5): 565.
- [4] 廖矛川, 刘永灏, 肖培根. 蒙古香蒲、宽叶香蒲和长苞香蒲花粉的黄酮类化合物的研究 [J]. *植物学报*, 1989, 31(12): 939.
- [5] Okuyama T, Hosoyama K, Hiraga Y, *et al.* The constituents of *Osmunda* spp. II¹) A new flavonol glycoside of *Osmunda asiatica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1978, 26(10): 3071.
- [6] Xu ZH, Liu XK, Xu GS. Study on chemical constituents of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv [J]. *China J Chin Mater Med*, 1995, 20(8): 484.
- [7] 李增亮, 张琳, 田景奎, 等. 乌饭树叶的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(18): 2087.
- [8] Achenbach H, Stocker M, Constenla MA. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca* [J]. *Phytochemistry*. 1988, 27: 1835.
- [9] Xue Z, Li S, Wang SJ, *et al.* Studies on chemical constituents from the corn of *Cremastra appendiculata* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2005, 30(7): 511.
- [10] Duan JA, Zhou RH, Zhao SX, *et al.* The chemical constituents of flavonoids and phenolic acid compounds of leaves from *Nitraria tangutorum* Bor. in China [J]. *J Plant Res Environ*, 1999, 8(1): 6.
- [11] 张卫东, 孔德云, 秦路平, 等. 灯笼花的化学成分研究 (I) [J]. *中国医药工业杂志*, 1998, 29(11): 498.
- [12] Lonnberg H, Kulonpaa A. Mechanisms for the acidcatalyzed hydrolysis of some alkyl aldofuranosides with the *trans*-1, 2-configuration [J]. *Acta Chem Scand Ser A*, 1977, A31(4): 306.
- [13] 于德泉. 分析化学手册. 第七分册 [M]. 第 2 版. 北京: 化工出版社, 1999: 901.
- [14] 贾淑平, 曾睿, 但卫华, 等. 植物多酚药理作用的研究及应用 [J]. *中国药房杂志*, 2009, 20(12): 953.

[收稿日期] 2012-03-15

[修回日期] 2012-06-10

(上接第 274 页)

- [7] 刘强, 吕志平, 朱红霞. 黄芩苷渗透不同动物皮肤的吸收研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(5): 315.
- [8] 刘养凤, 张伯礼. 冰片的药理学研究进展 [J]. *中医药学报*, 2003, 31(6): 55.
- [9] 王晖, 吴铁. 薄荷及其有效成分药理作用的研究概况 [J]. *中草药*, 1998, 29(6): 423.
- [10] 毛庆祥, 常文军, 蔡全才. 桉叶油吸收促进剂研究进展 [J]. *药学实践杂志*, 2003, 21(4): 205.
- [11] 杨宇杰, 王春民. 炎痛平颗粒的抗炎镇痛作用实验研究 [J]. *中草药*, 2001, 32(6): 90.
- [12] 曹春然, 周建平, 王志斌. 痛平膏主要药理作用实验研究. *中*

华实用医药杂志 [J]. 2006, 5(2): 92.

- [13] 顾家富. 一种炎痛平膏及其制备方法 [P]. 中国专利, 98101780.0. 1998-11-04.
- [14] 张苏, 高永良. 吸收促进剂的研究进展 [J]. *科学技术与工程*, 2004, 4(8): 732.
- [15] Narayanasamy Kanikkannan, Mandip Singh. Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols [J]. *Int J Pharm*, 2002, 248(1-2): 219.
- [16] 仇微红, 郭世宁, 石达友. 活血祛瘀类中药研究进展 [J]. *中兽医医药杂志*, 2008, (1): 71.

[收稿日期] 2011-12-08

[修回日期] 2012-03-31