

柱前衍生化 RP-HPLC 测定铁皮石斛中的氨基酸的含量

张亮¹, 鲁芹飞¹, 张扬¹, 徐香琴¹, 徐兰芳¹, 曾毅¹, 黄松^{1,2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学 中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的:测定不同产地的铁皮石斛样品中氨基酸的含量。方法:样品以异硫氰酸苯酯(PITC)为衍生化试剂,与铁皮石斛中氨基酸柱前衍生,采用高效液相色谱法测定其含量,采用 CAPCELL PAK C₁₈ SG300 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 [0.05 mol·L⁻¹乙酸钠缓冲液(以乙酸调 pH 6.5)-乙腈(1:1)](A)-[0.05 mol·L⁻¹乙酸钠缓冲液(以乙酸调 pH 6.5)](B)梯度洗脱,柱温 25 ℃,流速 0.6 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm。结果:游离氨基酸和总的氨基酸的回收率范围分别为 92.48% ~97.30% 和 90.95% ~95.63%,RSD 都小于 3.0%,9 个不同产地的样品游离氨基酸的含量范围在 0.210 5% ~0.571 2%,总的氨基酸含量范围在 3.670 8% ~6.890 4%,必需氨基酸占总的游离氨基酸的比例为 0.094 4% ~0.186 0%;必需氨基酸占总的氨基酸的比例范围为 0.338 5% ~0.374 1%。结论:该方法灵敏、准确,具有良好的重复性和稳定性,可用于铁皮石斛中氨基酸的检测,不同产地的铁皮石斛样品其氨基酸的含量存在差异,必需氨基酸的比例也存在差异

[关键词] 铁皮石斛;柱前衍生化;氨基酸;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0061-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220061

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.1025.017.html>

[网络出版时间] 2014-10-10 10:25

Pre-column Derivatization RP-HPLC Determination of Amino Acids in *Dendrobii Officinalis Caulis*

ZHANG-Liang¹, LU Qin-fei¹, ZHANG Yang¹, XU Xiang-qin¹, XU Lan-fang¹,
ZENG Yi¹, HUANG Song^{1,2*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Institution for Mathematics and Theoretics Engineering Research, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of amino acids of different origin of *Dendrobii Officinalis Caulis*. **Method:** The amino acids in *Dendrobii Officinalis Caulis* pretreated with phenyl isothiocyanate (PITC) and the content of derivatives was determined by HPLC. The determination was performed on CAPCELL PAK C₁₈SG300 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with mobile phase A consisted of sodium acetate-acetic acid buffer solution (adjusted pH to 6.5 with acetic acid) -1% acetonitrile and mobile phase B consisted of sodium acetate-acetic acid buffer solution (adjusted pH to 6.5 with acetic acid); gradient elution. The column temperature was 25 ℃, flow rate was 0.6 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 254 nm. **Result:** The recovery of free amino acid and total amino acids were in the range of 92.48% -97.30% and 90.95% -95.63%, the RSD values are less than 3%. Different origin of free amino acid content of 10 samples in the range of 0.210 5% -0.571 2%, the total amino acid content in the range of 3.670 8% -6.890 4%, the essential amino acids

[收稿日期] 20140506(031)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2008A030101009);广东省教育部产学研结合项目(2010B090400474);广东省科技计划项目(2011A030100011)

[第一作者] 张亮,在读硕士,从事中药新药研究开发,Tel:020-39359731,E-mail:j1195134451@qq.com

[通讯作者] *黄松,博士,研究员,硕士生导师,从事中药新药研究开发,Tel:020-32503212,E-mail:huangnn421@163.com

accounted for the proportion of total free amino acids in the range of 0.094 4% -0.186 0% and accounted for the proportion of total amino acids in the range of 0.338 5% to 0.374 1%. **Conclusion:** The method is sensitive, accurate, with good repeatability and stability, can be used for the detection of amino acids in *Dendrobii Officinalis Caulis*, there was significant difference between the different origin of *Dendrobium candidum* samples of amino acid, there are differences in the proportion of essential amino acids.

[**Key words**] *Dendrobii Officinalis Caulis*; pre-column derivatization; amino acid; HPLC

铁皮石斛具有滋阴益胃、清热生津、益智安神、强精壮骨之功效,一直以来,被视为名贵药材^[1]。目前对铁皮石斛的研究多集中在多糖方面,氨基酸方面的研究相对较少,有关铁皮石斛氨基酸类成分的含量分析均是使用氨基酸分析仪^[2-6],因为其局限性,限制了氨基酸的研究。近年来柱前衍生反相高效液相色谱法分析氨基酸技术有了广泛应用^[7-11],相应的促进了氨基酸的进一步研究。目前常用的柱前衍生剂有邻苯二甲醛(OPA)、氯甲酸苄甲酯(FMOC-Cl)、异硫氰酸苯酯(PITC)、丹酰氯(Dansyl-Cl)等^[12]。本实验采用 PITC 作为柱前衍生剂,结合反相高效液相色谱技术测定了不同产地的铁皮石斛药材中氨基酸的含量,以期对铁皮石斛中氨基酸的深入研究打好基础,同时为铁皮石斛药材的综合应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括 SPD-20A 型紫外-可见光检测器),BP110S 型电子天平和 CP225D 型电子天平(德国 Sartorius),HWS24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司),KQ3200DE 型医用数控超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂 铁皮石斛的药材由广东永生源生物科技有限公司种植基地提供,其他不同产地批次的铁皮石斛药材由广州中医药大学新药开发研究中心黄松老师收集提供,经广州中医药大学陈建南研究员鉴定为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale*,标本存放于广州中医药大学新药开发研究中心。17 种氨基酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 624-200104),PITC 衍生剂(色谱纯,美国 Sigma 公司),甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),无水醋酸钠(分析纯,天津市大茂化学试剂厂),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相[0.05 mol·L⁻¹ 乙酸钠缓冲液(以乙酸调 pH 6.5)-乙腈(1:1)](A)-[0.05 mol·L⁻¹ 乙酸钠缓冲液(以乙酸调 pH 6.5)](B) 梯度洗

脱(0~15 min,5% A;15~60 min,5%~23% A;60~100 min,23%~50% A;100~115 min,50%~60% A;115~125 min,60%~5% A),检测波长 254 nm,流速 0.6 mL·min⁻¹,柱温室温。

2.2 氨基酸对照品溶液的制备 精密称取 17 种氨基酸对照品[天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、胱氨酸(Cys-Cys)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)]各 20 mg,分别置 10 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸使其溶解,并定容至刻度,即得 17 种氨基酸单一对照品溶液。分别精密移取谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、精氨酸对照品溶液 2 mL,置 25 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸稀释至刻度,即得氨基酸混合对照品溶液 1。分别精密移取酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、赖氨酸对照品溶液 2 mL,置 25 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸稀释至刻度,即得氨基酸混合对照品溶液 2。

分别精密移取氨基酸混合对照品溶液 1、氨基酸混合对照品溶液 2 各 1.0 mL,置 10 mL 离心管中,精密加入 1.0 mol·L⁻¹ 三乙胺乙腈溶液和 0.1 mol·L⁻¹ PITC 乙腈溶液各 2.0 mL,漩涡混匀 1 min,室温下放置 1 h,加正己烷 4 mL,漩涡混匀 1 min,室温下放置 10 min,弃去上层正己烷层,反复萃取 3 次,移取下层液置 5 mL 量瓶中,用 0.05 mol·L⁻¹ 乙酸钠溶液(pH 6.5)定容至刻度,微孔滤膜(0.22 μm)过滤,进样 10 μL。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 游离氨基酸的供试品溶液 准确称取铁皮石斛粗粉 1.00 g 置具塞锥形瓶中,加 20 倍量 0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液,密塞,超声提取 30 min,抽滤,滤液用 15% NaOH 溶液调至中性。合并提取溶液,加压回收溶剂至干,0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶解,转移到 5 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸稀释至刻度,取

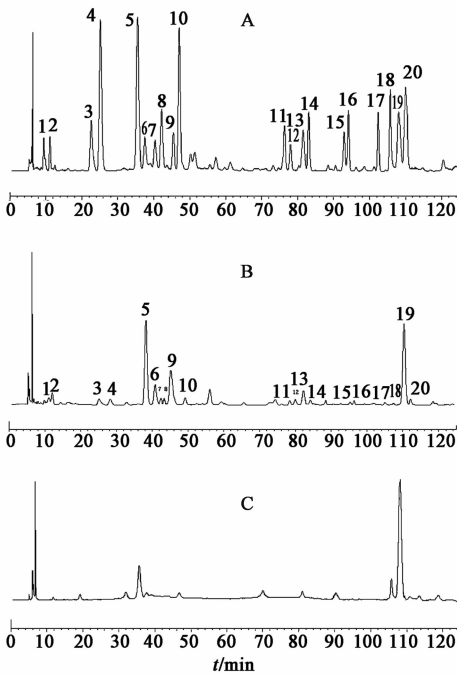
2.0 mL 供试品溶液置 10 mL 离心管中,按照对照品溶液的制备方法进行衍生,微孔滤膜(0.22 μm)过滤,进样 15 μL 。

2.3.2 总氨基酸供试品溶液 取铁皮石斛样品 0.1 g,精密称定,置具塞试管中,加 6 mol·L⁻¹的盐酸 10 mL,于 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中水解 24 h 后取出放冷,过滤,滤液转移到蒸发皿中,水浴挥干,用 0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶解并定容至 10 mL,离心,精密吸取上清液 2.0 mL,置 10 mL 离心管中,按照供试品溶液的制备方法进行衍生,微孔滤膜(0.22 μm)过滤,进样 15 μL 。

2.3.3 空白溶液 取 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL,按 2.2 项下方法自“置 10 mL 离心管中,精密加入 1.0 mol·L⁻¹ 三乙胺乙腈溶液”起操作,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 取混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶液各 10 μL ,按 2.1 项下色谱条件进行测定,17 种氨基酸色谱峰分离度良好,空白无干扰,见图 1。



A: 对照品; B: 样品; C: 阴性对照

(1. Asp; 2. Glu; 3. Ser; 4. Gly; 6. His; 7. Thr; 8. Ala; 9. Arg;

10. Pro; 11. Tyr; 12. Val; 13. Met; 14. Ile; 15. Leu; 16. Cys-Cys;

17. Phe; 20. Lys; 5, 18, 19 号峰为衍生剂峰)

图 1 铁皮石斛中氨基酸的 HPLC

2.4.2 线性范围的考察 精密吸取衍生后的对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20, 25 μL , 注入高效液相色谱仪中,按 2.1 项下色谱条件测定面积,以进样量为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得 17

种氨基酸的回归方程,见表 1。

表 1 17 种氨基酸的回归方程、相关系数及线性范围

成分	回归方程	线性范围/ μg	r
Asp	$Y = 3\ 245\ 178X + 5\ 255.6$	0.032 432 ~ 0.810 8	0.999 9
Glu	$Y = 4\ 421\ 356X - 6\ 817.2$	0.031 168 ~ 0.779 2	0.999 8
Ser	$Y = 6\ 756\ 984X - 31\ 308$	0.031 344 ~ 0.783 6	0.999 6
Gly	$Y = 8\ 245\ 631X - 45\ 947$	0.031 472 ~ 0.786 8	0.999 9
His	$Y = 4\ 986\ 327X - 62\ 118$	0.032 224 ~ 0.805 6	0.999 9
Thr	$Y = 5\ 756\ 482X + 46\ 752$	0.031 712 ~ 0.792 8	0.999 9
Ala	$Y = 6\ 632\ 994X + 35\ 387$	0.031 376 ~ 0.784 4	0.999 8
Arg	$Y = 4\ 532\ 697X - 20\ 358$	0.032 016 ~ 0.800 4	0.999 9
Pro	$Y = 6\ 423\ 516X - 902.43$	0.031 824 ~ 0.795 6	0.999 9
Tyr	$Y = 4\ 876\ 941X + 28\ 241$	0.032 672 ~ 0.816 8	0.999 9
Val	$Y = 5\ 532\ 688X + 69\ 147$	0.032 224 ~ 0.805 6	0.999 8
Met	$Y = 4\ 789\ 517X + 21\ 705$	0.032 048 ~ 0.801 2	0.999 8
Ile	$Y = 4\ 635\ 899X + 91\ 980$	0.030 928 ~ 0.773 2	0.999 4
Leu	$Y = 7\ 785\ 146X + 180\ 460$	0.032 576 ~ 0.814 4	0.999 6
Cys-Cys	$Y = 2\ 965\ 338X - 48\ 891$	0.031 632 ~ 0.790 8	0.999 8
Phe	$Y = 4\ 536\ 874X + 101\ 692$	0.031 568 ~ 0.789 2	0.999 5
Lys	$Y = 6\ 863\ 549X + 81\ 062$	0.031 728 ~ 0.793 2	0.999 9

2.4.3 精密度试验 取 2.2 中衍生后的混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录 17 种氨基酸的峰面积,17 种氨基酸的 RSD 皆小于 3.0%

2.4.4 稳定性试验 取 2.3 项下的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别于 0, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样,测定峰面积,17 种氨基酸的 RSD 皆小于 3.0%。

2.4.5 重复性试验 按 2.3 项下方法制备总的游离氨基酸和总的氨基酸供试品溶液,对同一批样品分别平行制备 6 份供试品溶液,衍生后取 15 μL 注入色谱仪,测 17 种氨基酸的峰面积并计算含量,游离氨基酸和总的氨基酸的 17 种氨基酸的 RSD 皆小于 3.0%,结果表明试验的重复性较好。

2.4.6 游离氨基酸加样回收试验 取已测知含量的样品 6 份各 1.0 g,准确称定,再分别加入适量的标准品溶液,按 2.3.1 项下自“加 20 倍的 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液,超声提取 30 min”起操作,制备所需溶液,按上述色谱条件进样测定,计算回收率,从表 2 中可以看出 17 种氨基酸的平均回收率在 92.48% ~ 97.30%,说明该方法的准确性较好。

2.4.7 总的氨基酸加样回收试验 取已测知含量的样品 6 份,各 0.05 g,准确称定,再分别加入适量的对照品溶液,按 2.3.2 项下自“置具塞试管中,加

表 2 17 种游离氨基酸、总氨基酸的加样回收试验 %

氨基酸种类	游离氨基酸		总氨基酸	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
Asp	93.45	2.65	91.98	2.93
Glu	94.44	2.76	94.57	2.50
Ser	95.74	1.79	95.63	2.22
Gly	96.24	2.02	95.35	1.80
His	95.90	2.84	93.01	2.53
Thr	94.62	2.71	93.44	1.41
Ala	94.15	2.95	93.43	2.74
Arg	96.60	2.68	91.13	1.87
Pro	97.30	2.42	92.90	2.65
Tyr	96.70	2.74	95.04	2.20
Val	95.75	2.65	92.03	1.87
Met	96.55	2.93	96.04	2.36
Ile	93.90	2.01	94.71	1.34
Leu	93.96	1.51	92.65	2.93
Cys-Cys	92.48	2.61	91.36	2.25
Phe	94.62	2.35	90.95	2.62
Lys	96.68	2.52	93.64	2.40

6 mol·L⁻¹的盐酸 10 mL,于 110 ℃烘箱中水解 24 h”起操作,制备所需溶液,按上述色谱条件进样测定,计算回收率,从表 2 可以看出 17 种氨基酸的平均回收率在 90.95% ~ 95.63%,说明该方法的准确性较好。

2.5 样品测定 按照本实验的方法测定样品中游离氨基酸和总的氨基酸的含量,结果见表 3。

根据表 3 看出,不同产地的铁皮石斛样品中总的氨基酸含量和游离氨基酸的含量存在较大差异,必需氨基酸所占的比例也存在较大的差异,并且同一产地的样品总氨基酸和游离氨基酸的含量也存在差异,对应的必需氨基酸所占的比例也存在较大的差异。

人体有 8 种必需氨基酸(苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、色氨酸、蛋氨酸),这些氨基酸人体自身不能合成,要由食物提供。如果缺乏这些必需的氨基酸,人体的正常生长和发育就会受到影响,严重的会导致疾病。所以,中药中含有的氨基酸可以成为辅助成分或是主要的成分治疗某些疾病。由于色氨酸不稳定,本试验测定计算样

表 3 不同产地铁皮石斛种氨基酸的含量 %

No.	产地	总氨基酸		总氨基酸中必需氨基酸所占的比例		总游离氨基酸		总游离氨基酸中必需氨基酸所占的比例	
		总氨基酸	RSD	必需氨基酸所占的比例	RSD	总游离氨基酸	RSD	必需氨基酸所占的比例	RSD
T11	师宗	4.28	6.39	0.365 3	8.40	0.35	12.73	0.149 1	4.33
T13	西林	6.52	4.72	0.363 9	8.40	0.41	27.89	0.164 9	5.74
T15	南雄	4.16	6.54	0.357 0	8.69	0.32	15.54	0.1860	3.43
T16	广昌	4.35	11.09	0.359 5	6.25	0.23	16.19	0.113 6	10.70
T17	会昌	4.35	11.21	0.338 5	10.11	0.30	27.77	0.134 2	4.43
T18	河源	4.50	12.09	0.362 2	7.50	0.26	22.95	0.094 4	10.94
T19	井冈山	5.16	17.16	0.361 0	5.14	0.27	19.07	0.117 7	10.81
T25	武夷山	4.20	8.18	0.365 4	5.16	0.28	22.05	0.127 8	5.70
T29	冠豸山	4.58	6.95	0.374 1	4.54	0.34	14.27	0.137 7	3.41

品中的剩余 7 种必需氨基酸所占的比例,9 个产地的样品中必需氨基酸占总的游离氨基酸的比例范围为 0.094 4 ~ 0.186 0, T18(河源)最低, T15(南雄)最高;必需氨基酸占总的氨基酸的比例范围为 0.338 5 ~ 0.374 1, T17(会昌)最低, T29(冠豸山)最高。

3 讨论

氨基酸的种类远远不止本研究中的 17 种,由于条件有限,本研究采用柱前衍生 HPLC 技术测定了

铁皮石斛样品中常见的 17 种氨基酸,并且计算了 17 种氨基酸的总量和必需氨基酸所占的比例。通过测定和计算发现,不同产地的样品氨基酸总量和必需氨基酸所占的比例存在差异,并且发现必需氨基酸占总氨基酸的比例较必需氨基酸占总游离氨基酸的比例要大,说明药材中的人体必需氨基酸大多结合形成诸如糖蛋白类、多肽类、蛋白质类等物质,仅有少量比例的呈游离态形式在做方法学考察时,在总的氨基酸的加样回收实验中,回收率很低,分析

可能的原因是加入的对照品要经过浓酸和高温的处理,可能会造成部分氨基酸的结构破坏,故使得回收率低。同时,本文作者先对样品进行提取,再往提取液中加入相应的对照品溶液,然后显色、测吸光度,计算回收率,得到的回收率可以达到 95% 以上,由此说明我们的含量测定方法准确度可以到达要求,而在总的氨基酸的提取过程中,提取的条件可能对氨基酸的结构造成了破坏,所以总氨基酸的含量可能比实验中测出的数值还要高。

[参考文献]

[1] 李玲,邓晓兰,赵兴兵,等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 肿瘤药学,2011,1(2):90.
[2] 蒋秀美,刘骅,张治国. 铁皮石斛和金钗石斛的氨基酸分析[J]. 浙江省医学科学院学报,1999(39):26.
[3] 李妮亚,高培元,王紫. 海南石斛属和金石斛属植物多糖及氨基酸含量分析[J]. 植物资源与环境学报,2004,4:57.
[4] 何铁光,苏江,王灿琴,等. 铁皮石斛不同来源材料多糖和氨基酸含量的比较[J]. 广西农业科学,2007,1:32.

[5] 黄民权,阮金月. 铁皮石斛氨基酸组分分析[J]. 中药材,1997,1:32.
[6] 吴庆生,丁亚平,杨道麒,等. 安徽霍山三种石斛中游离氨基酸分析[J]. 安徽农业科学,1995,3:268.
[7] 翟旭峰,郭晓蕾,朱元平等. 柱前衍生化 RP-HPLC 测定不同产地灵芝中 6 种氨基酸的含量[J]. 中药材,2011,34(12):1846.
[8] 孙莲,张焯,王岩,等. 柱前衍生化 RP-HPLC 测定芫菁子中的 12 种游离氨基酸[J]. 华西药理学杂志,2008,23(4):490.
[9] 刘丽敏,王海敏,虞海霞,等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定西洋参中游离氨基酸[J]. 中成药,2009,31(2):275.
[10] 孙莲,张焯,孟磊,等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定桑叶中 16 种游离氨基酸的含量[J]. 中国药房,2008(36):2830.
[11] 邹秦文,肖新月,程显隆,等. 百令胶囊中 17 种氨基酸的柱前衍生化 RP-HPLC 含量测定[J]. 药物分析杂志,2010,30(9):1630.
[12] 宋志峰,王丽,纪锋,等. 氨基酸分析中的柱前衍生技术[J]. 吉林农业科学,2004(6):54.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国医药导报》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的医药卫生期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、美国化学文摘(CA)收录期刊、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库收录期刊,所刊登的文章被万方数据、中国知网、中文科技期刊数据库全文收录。每期定价 20 元,全年 36 期优惠价 540 元。

本刊设专家论坛、综述、论著、实验研究、药理与毒理、临床研究、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、病例报告、医疗器械、中医中药、生物医药、药品检验、制剂与技术、药师与临床、不良反应监测、药物经济学、调查研究、护理研究、教育研究、科研管理、法规与标准、卫生研究、医疗管理、产业与市场、医药监管、工作探讨等栏目。是广大医药卫生科研、教育、医护、药事、经营管理等人员了解医药研究进展、发展动态,展示医药科研成果,学习先进经验,探讨工作难题,交流和提高业务学术水平的得力助手,也是发表医药学术论文的阵地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025

投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533

传真:010-59679056 投稿信箱:yydb@vip.163.com

网址:www.yiyaodaobao.com.cn