DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2019.05.011

黑果枸杞叶槲皮素的制备及其体外抗氧化活性研究

段亚云,李建颖*,程瑶,白金金
(天津商业大学 生物技术与食品科学学院,天津市食品生物技术重点实验室,天津 300134)

摘　要:采用超声波-微波协同提取黑果枸杞叶醇提物,利用大孔吸附树脂分离富集黑果枸杞叶总黄酮,采用Sephadex LH-20,分离纯化槲皮素。利用高效液相色谱-质谱联用法(high performance liquid chromatography and mass spectrometry,HPLC-MS)对所得的槲皮素进行结构鉴定。通过考察槲皮素的总抗氧化活性、清除DPPH自由基、$ABTS^+$自由基、超氧阴离子自由基以及脂质过氧化体系中脂质过氧化抑制率5个指标,由此评价槲皮素的体外抗氧化活性。研究结果表明,槲皮素在5种自由基中清除$ABTS^+$自由基能力最强,浓度在300 nmol/L~400 nmol/L时清除率达68.0 %。清除DPPH自由基能力和清除超氧阴离子自由基能力基本持平。

关键词:黑果枸杞叶;槲皮素;制备;高效液相色谱-质谱联用法;抗氧化

Studies on the Preparation of Quercetin and Its Antioxidation *in Vitro* from Leaves of *Lycium ruthenicum* Murr.

DUAN Ya-yun, LI Jian-ying*, CHENG Yao, BAI Jin-jin
(College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, Tianjin 300134, China)

Abstract: The total flavonoids of Leaves of *Lycium ruthenicum* Murr. were separated and enriched by macroporous adsorption resins, and the quercetin was separated and purified by Sephadex LH-20. The structure of the quercetin was identified by high performance liquid chromatography and mass spectrometry (HPLC-MS). The antioxidant activity of the quercetin *in vitro* was evaluated by five factors: determination of total antioxidant capacity, scavenging effects of DPPH free radical, $ABTS^+$ free radical and super-oxide anion, and lipid peroxidation inhibition rate in lipid peroxide system. The results showed that the quercetin had the strongest ability to remove $ABTS^+$ free radical. Under the concentration of quercetin in 300 nmol/L-400 nmol/L, the clearance rate can reach 68.0 %. The quercetin had the almost same ability to clear DPPH free radical and super-oxide anion free radical.

Key words: leaves of *Lycium ruthenicum* Murr.; quercetin; preparation; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS); antioxidant

引文格式:
段亚云,李建颖,程瑶,等.黑果枸杞叶槲皮素的制备及其体外抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2019,40(5):59-64
DUAN Yayun, LI Jianying, CHENG Yao, et al. Studies on the Preparation of Quercetin and Its Antioxidation *in Vitro* from Leaves of *Lycium ruthenicum* Murr.[J].Food Research and Development,2019,40(5):59-64

基金项目:天津市大学生创新训练计划项目(201810069053)

作者简介:段亚云(1992—),女(汉),硕士研究生,研究方向:食品加工与贮藏。
* 通信作者:李建颖(1961—),女(汉),教授,硕士研究生,研究方向:天然产物的提取、分离与纯化。

黑果枸杞为茄科枸杞属植物，主要生长在荒地、沙漠等较为干旱的地区。其叶可以制茶、降血脂[1]。研究表明，黑果枸杞叶含有多种生物活性成分，随着提取分离技术的不断提高，对黑果枸杞叶化学成分的分析研究也在不断深入，其主要作用有镇静安眠、镇痛抗惊厥、抗氧化等[2]。

特别是对于黑果枸杞叶黄酮类化合物的研究表明，其具有一定的抗氧化活性，是天然抗氧化剂研究的热点。槲皮素（quercetin）是黑果枸杞叶重要的黄酮成分之一，在治疗糖尿病的研究中发现，槲皮素能够抑制实验大鼠肠道中的α-葡萄糖苷酶的活性，从而具有降血糖潜能[3]，但其抗氧化活性的系统研究鲜见报道。本研究采用清除 DPPH 自由基、$ABTS^{+}$自由基等 5 种方法对槲皮素体外抗氧化活性能力作出评价，对其实际的生产应用具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑果枸杞叶：甘肃省民勤县；芦丁标准品（纯度：96.6 %）：Dr. Ehrenstorfer GmbH；D-101 型大孔树脂：南开大学化工厂；0.45 μm 微孔滤膜：宁波和平注射器厂；葡聚糖 Sephadex LH-20：天津赢达稀贵化学试剂厂；钼酸铵、磷酸钠、1,1-二苯基-2-三硝基肼（DPPH）、2,2-联氮-二（3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐（ABTS）、磷酸盐缓冲液、过硫酸钾、磷酸氢钠、磷酸二氢钾、氯化硝基四氮唑蓝（nitrotetrazolium blue chloride，NBT）、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide，NADH）、吩嗪硫酸甲酯（phenazine methosulfate，PMS）、三氯乙酸（trichloroacetic acid，TCA）、硫代巴比妥酸（thiobarbituric acid，TBA）（均为分析纯）：天津鑫桥化工有限公司。

1.2 仪器与设备

R50 型旋转蒸发器：上海申生科技有限公司；DH-101 电热鼓风干燥箱：上海精密科学仪器有限公司；U-VD-680-1 型紫外检测仪：上海金达生化仪器有限公司；5418R 型低温冷冻离心机：德国艾本德有限公司；安捷伦 1200 高效液相色谱仪、G6410B Triple Quad LC/MS 美国安捷伦科技有限公司；UV2550 型紫外分光光度计：日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 黑果枸杞叶总黄酮的提取

将黑果枸杞叶置于 100 ℃烘箱中杀青 30 min，放入 60 ℃烘箱中，烘干至恒重，粉碎后过 100 目筛，经超声波-微波协同作用，在微波功率 176 W，液料比 19∶1（mL/g），提取时间 9.9 min，乙醇浓度 69 %的条件下进行提取。之后进行抽滤，取滤液，经 55 ℃下减压浓缩后，得黑果枸杞叶醇提物[4]。然后加水溶解通过 D-101 大孔吸附树脂柱，依次采用蒸馏水，3 BV 25 %乙醇，3 BV 45 %乙醇，6 BV 95 %乙醇进行洗脱，收集 95 %乙醇洗脱液，真空干燥，即得黑果枸杞叶总黄酮。

1.3.2 槲皮素的分离纯化

取一定量总黄酮，用 20 %甲醇超声溶解，离心并采用 0.45 μm 微孔滤膜进行过滤，上样于 Sephadex LH-20 色谱柱，依次用蒸馏水、30 %甲醇、60 %甲醇和无水甲醇进行洗脱。设定流速为 0.5 mL/min，收集馏分，每管 10 mL（每 1/20 保留体积接成一馏分），共洗脱 3 个柱体积。洗脱完成后，利用高效液相色谱-串联质谱（high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry，HPLC-MS）检测所得流分中黄酮类化合物的纯度，合并相同组成流分。将最终得到的相应黄酮类化合物分别进行浓缩，干燥备用。由此可制备并纯化槲皮素[5]。

1.3.3 槲皮素的结构鉴定

采用 HPLC-MS/MS 鉴定所得的黑果枸杞叶黄酮类化合物的结构，依据不同成分的色谱特征和质谱特征的不同来鉴定黑果枸杞叶黄酮中的不同成分[6]，并由此确定槲皮素。

1.3.3.1 色谱条件

色谱柱：Agilent Poroshell EC-C_{18} 柱（4.6 mm×50 mm，2.7 μm）；流动相：乙腈-水（含 0.1 %甲酸）=50∶50（体积比）；柱温：35 ℃；进样量：10 μL。

1.3.3.2 质谱条件

电离方式：电喷雾 ESI（-）；扫描方式：MS-Scan 及 Product Ion；电喷雾电压：4 000 V；雾化气体：N_2；雾化气压力：35 p.s.i；雾化气流速：10 L/min；离子源温度：350 ℃；碰撞气体：高纯氮气；碰撞气压力：0.2 MPa。

1.3.4 槲皮素体外抗氧化活性的测定

1.3.4.1 样品溶液的配制

精密称定槲皮素和芦丁粉末，用 50 %乙醇稀释样品溶液，得到浓度分别为 20、50、100、200、300、400 nmol/L 的样品溶液。

1.3.4.2 试剂配制

磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）：精密称取 8.0 g NaCl，0.2 g KCl，1.44 g Na_2HPO_4，0.24 g KH_2PO_4，溶于 800 mL 蒸馏水中，充分搅拌至完全溶

解，定容至 1 L 即得 pH 值为 7.4 的 PBS（0.2 mol/L）。

磷钼试剂：分析天平精密称取 2.67 g 磷酸钠（$Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$）于小烧杯中，加入 8.2 mL 浓硫酸，充分搅拌至溶解；精密称取 1.24 g 钼酸铵[$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$]，倒入之前小烧杯中，充分搅拌至完全溶解后，将小烧杯中溶液转移至 250 mL 容量瓶中，并用蒸馏水多次润洗最终定容。磷钼试剂的终浓度为 0.6 mol/L 浓硫酸，28 mmol/L 磷酸钠和 4 mmol/L 钼酸铵的溶液。现用现配。

DPPH 工作液：精密称取 3.94 mg DPPH 固体粉末，溶于 100 mL 无水乙醇中，配成 DPPH 工作液（1.0×10^{-4} mol/L），4 ℃避光保存。

ABTS 工作液的配制：将 12 mLABTS（7.4 mmol/L）溶液与 0.2 mL $K_2S_2O_8$（2.6 mmol/L）混合，并在黑暗的条件下室温保持 12 h 后，用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液稀释 40 倍~50 倍，以在 734 nm 处获得 0.68~0.72 的吸光值，4 ℃避光保存。

NBT 溶液：精密称取 124 mg NBT 固体粉末，用 PBS 完全溶解至 50 mL 棕色容量瓶中，定容，得 NBT 工作液（0.3 mol/L），4 ℃保存备用。

NADH 溶液：精密称取 16.6 mg NADH 固体粉末，用 PBS 充分溶解并置于 50 mL 棕色容量瓶中定容，得 NADH 工作液（0.468 mol/L），4 ℃保存备用。

PMS 溶液：精密称取 0.812 mg PMS 固体粉末，用 PBS 充分溶解并置于 50 mL 棕色容量瓶中定容，即得 0.06 mol/L PMS 工作液，4 ℃保存备用。

卵黄悬液：将卵黄与浓度为 0.1 mol/L，pH 7.4 的磷酸盐缓冲液配制成 1∶1（体积比）悬液，磁力搅拌 15 min，再用磷酸盐缓冲液稀释成 pH 值为 1.25 的悬液。现用现配。

1.3.4.3　总抗氧化能力

采用磷钼络合物法[7-8]测定槲皮素的总抗氧化活性。取不同浓度的样品溶液 0.6 mL 于 10.0 mL 的具塞试管中，加入 6.0 mL 磷钼试剂，涡旋混匀，于 95 ℃恒温水浴中反应 90 min。于 695 nm 波长下分别测定其吸光度。吸光度值越高表明抗氧化剂的抗氧化能力越强。由此比较槲皮素与芦丁标准品的抗氧化能力。

1.3.4.4　对 DPPH 自由基的清除作用

参照孙丽萍等[9]方法测定槲皮素清除 DPPH 自由基的能力。取不同浓度的样品溶液 0.1 mL 于 1.5 mL 的离心管中，加入 0.9 mL DPPH 溶液（0.1 mmol/L），涡旋混匀，闭光反应 30 min，于 517 nm 波长下分别测其吸光度，记作 A；用 50 %乙醇代替样品溶液，测其吸光度，记作 A_1；用无水乙醇代替 DPPH 溶液，测其吸光度，记作 A_0。根据公式（1）计算清除率。

$$清除率/\%=(1-\frac{A-A_0}{A_1})\times100 \quad (1)$$

1.3.4.5　对 $ABTS^+$自由基的清除作用

参照 Payet 等[10]和孟庆焕等[11]方法测定槲皮素清除 $ABTS^+$自由基的能力。取 4 mL 的 $ABTS^+$工作液于试管中，加入 1 mL 95 %的乙醇，混合均匀后静置 6 min，于 734 nm 波长下测定吸光度值为 A_0。将乙醇换成样品溶液用同样的方法测定吸光度为 A。根据公式（2）计算清除率。

$$清除率/\%=\frac{A_0-A}{A_0}\times100 \quad (2)$$

1.3.4.6　对超氧阴离子自由基的清除作用

取 1 mL 50 %乙醇于 1.5 mL 离心管中，作为参比进行空白对照；于 1.5 mL 离心管中先后加入 0.5 mL PBS、0.125 mL NADH、0.125 mL NBT、0.125 mL PMS，取不同浓度样品溶液 0.125 mL 于离心管中，摇匀后室温下反应 5 min，测定其在 560 nm 处的吸光度值 A；用 0.125 mL 50 %乙醇替换样品溶液，同样的方法测定其在 560 nm 处的吸光度值 A_1；向 1.5 mL 离心管中先后加入 0.875 mL PBS、0.125 mL 样品溶液，测定其在 560 nm 处的吸光度值 A_0。清除率的计算公式见公式（1）。

1.3.4.7　对脂质过氧化体系的抑制作用

参照胡贵丽等[12]方法测定槲皮素对脂质过氧化体系的抑制作用。取 0.1 mL 卵黄悬液、0.1 mL 样品溶液于离心管中，加入 0.1 mL $FeSO_4$（25 mmol/L），用磷酸盐缓冲液定容至 1.0 mL，在 37 ℃培养箱中培养 12 h，取出后加入 0.25 mL 20 % TCA 溶液，静置后离心 10 min，取 0.4 mL 上清液，加入 0.2 mL 0.8 % TBA 溶液，于沸水浴中反应 15 min，冷却后，于 532 nm 波长处测定吸光值 A_1，参比管为磷酸盐缓冲液，其他步骤相同，测定吸光值 A_0，根据公式（3）计算样品液对卵黄脂蛋白的脂质过氧化抑制率。

$$脂质过氧化抑制率/\%=\frac{A_0-A_1}{A_0}\times100 \quad (3)$$

2　结果与分析

2.1　提取物的定性鉴定

槲皮素二级质谱图如图 1 所示。

由二级质谱图得知：分子离子峰为 301.0[M−H]⁻，表明该化合物相对分子质量为 302，近似于槲皮素的相对分子质量。其他离子峰：151.0[M−150]⁻，120.5，以上离子碎片符合槲皮素的裂解规律。进一步参考相关文献[13]，即可鉴定该化合物为槲皮素。

槲皮素的色谱图如图 2 所示。

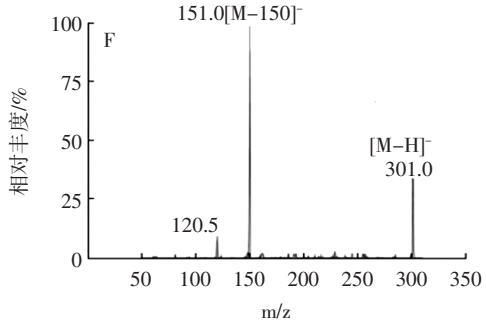

图 1 槲皮素质谱图

Fig.1 The mass spectrogram of quercetin

由槲皮素的色谱图得知：出现的色谱峰单一,且峰型、走势良好,呈左右对称,说明该化合物槲皮素成分单一,且纯度较高。

2.2 体外抗氧化活性的评价

2.2.1 总抗氧化能力

依据吸光度所得的槲皮素总抗氧化能力,以芦丁标准品作为阳性对照,研究槲皮素的抗氧化活性。测定结果如图 3 所示。

由图 3 可知,芦丁标准品有较好的抗氧化能力,而槲皮素在 20 nmol/L~300 nmol/L 时表现出抗氧化能力的不稳定性,但随着浓度的升高,抗氧化性逐渐增强,

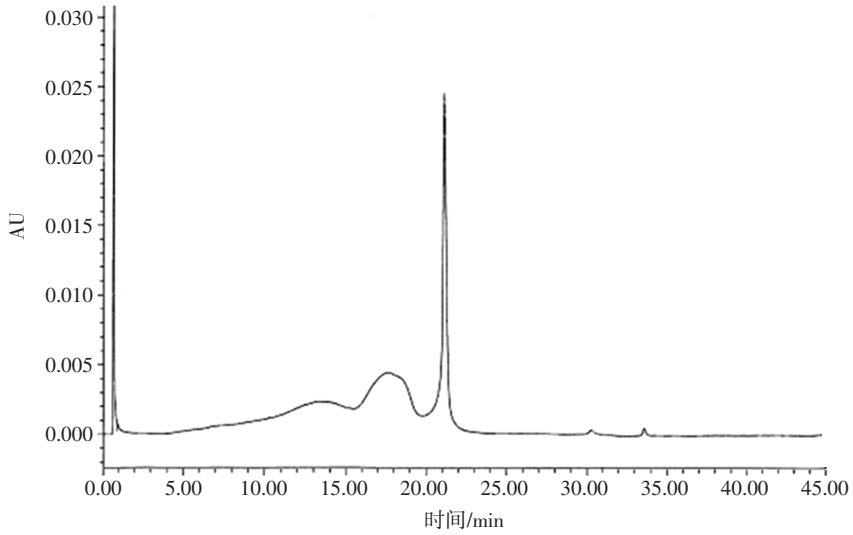

图 2 槲皮素色谱图

Fig.2 The chromatogram of quercetin

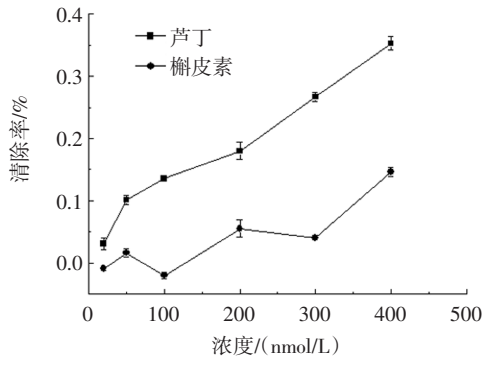

图 3 总抗氧化能力

Fig.3 The total antioxidant capacity

且趋于稳定。在浓度为 50 nmol/L~400 nmol/L 范围内,芦丁标准品的总抗氧化能力高于槲皮素的总抗氧化能力。

2.2.2 对 DPPH 自由基的清除作用

依据公式(1)所得的槲皮素对 DPPH 自由基的清除率,以芦丁标准品作为阳性对照,研究槲皮素的清除能力并探究其抗氧化活性,测定结果如图 4 所示。

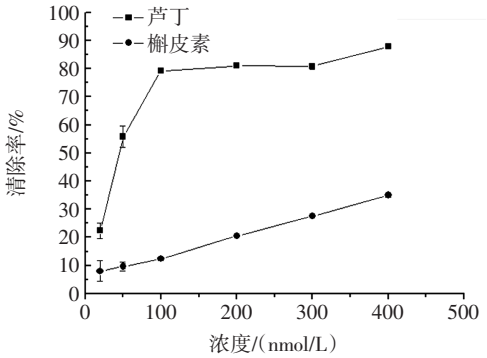

图 4 对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.4 The scavenging activity on DPPH free radical

由图 4 可知，在 20 nmol/L~400 nmol/L 范围内,随着浓度的增加，两者清除 DPPH 自由基的能力明显提高,且槲皮素的清除率与浓度量效关系十分明显。溶液浓度为 400 nmol/L 时,芦丁标准品清除率高达 87.86 %,

槲皮素的清除率也大于 35.04 %。但总体来说,在此浓度范围内二者清除 DPPH 自由基的能力有一定差距。

2.2.3　对 ABTS⁺自由基的清除作用

依据公式(2)所得的槲皮素对 ABTS⁺自由基的清除率,以芦丁标准品作为阳性对照,研究比较槲皮素的清除能力并探究其抗氧化活性,测定结果如图 5 所示。

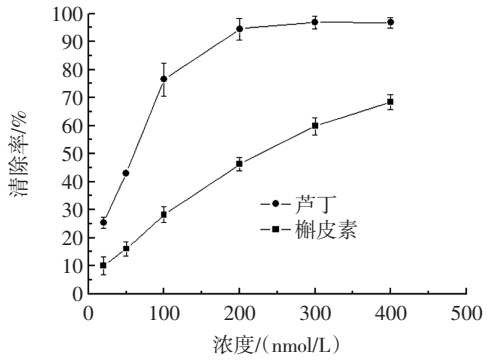

图 5　对 ABTS⁺自由基的清除能力

Fig.5　The scavenging activity on ABTS⁺ free radical

由图 5 可知，槲皮素和芦丁标准品对 ABTS⁺自由基均表现出不同程度的清除活性。二者均随其浓度的增加,清除率也随之增大,特别是槲皮素,浓度与清除率呈明显的量效关系,溶液浓度为 400 nmol/L 时,芦丁标准品清除率高达 96.8 %以上;槲皮素的清除率也大于 68.0 %。

2.2.4　对超氧阴离子自由基的清除作用

依据公式(1)所得的槲皮素对超氧阴离子的清除率,以芦丁标准品作为阳性对照,研究比较槲皮素的清除能力并探究其抗氧化活性,测定结果如图 6 所示。

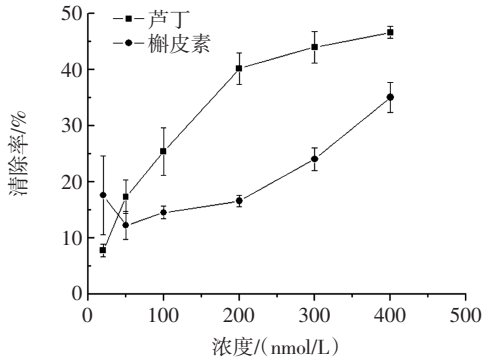

图 6　对超氧阴离子自由基的清除能力

Fig.6　The scavenging activity on the super-oxide anion free radical

由图 6 可知，在 50 nmol/L~400 nmol/L 浓度范围内,随着槲皮素和芦丁标准品浓度的增大,对超氧阴离子自由基的清除率逐渐增强;浓度低于 40 nmol/L 时槲皮素对超氧阴离子的清除能力高于芦丁标准品对超氧阴离子的清除能力，当浓度高于 40 nmol/L 时,结果相反,芦丁对照品在浓度 400 nmol/L 下,清除超氧阴离子的能力高于 46.0 %,槲皮素对超氧阴离子的清除能力达 35.1 %,在试验浓度的条件下,二者的清除能力还是有一定的差距,但随着浓度的增加,槲皮素的清除能力升高更加明显,有较好的量效关系。

2.2.5　对脂质过氧化体系的抑制作用

依据公式(3)所得的槲皮素对脂质过氧化体系的抑制率,以芦丁标准品作为阳性对照,研究比较槲皮素的清除能力并探究其抗氧化活性，测定结果如图 7 所示。

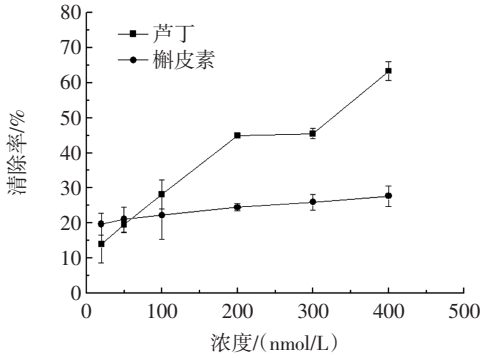

图 7　对脂质过氧化的抑制能力

Fig.7　The inhibiting activity on the lipid peroxidation

由图 7 可知,在试验浓度范围内,随着槲皮素和芦丁标准品浓度的增大，其脂质过氧化抑制率逐渐增强;槲皮素的脂质过氧化抑制率与浓度具有良好的线性关系;当浓度低于 50 nmol/L 时,槲皮素的脂质过氧化抑制率高于芦丁标准品,在 400 nmol/L 浓度下,槲皮素脂质过氧化抑制率为 27.7 %。当浓度在 50 nmol/L~400 nmol/L 时，芦丁标准品的脂质过氧化抑制率高于槲皮素。

3　结论

采用超声波-微波提取、大孔吸附树脂以及 Sephadex LH-20 等方法制备槲皮素。并采用 HPLC-MS/MS 鉴别所得化合物为槲皮素。通过考察槲皮素的总抗氧化活性，清除 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、超氧阴离子自由基以及脂质过氧化体系中脂质过氧化抑制率 5 个指标,由此评价槲皮素的体外抗氧化活性。研究结果表明,槲皮素具有一定的抗氧化活性,相同浓度下，槲皮素清除 3 种自由基的能力表现为：清除 ABTS⁺自由基能力最强,浓度在 300 nmol/L~400 nmol/L 时清除率达 68.0 %。清除 DPPH 自由基能力和清除超氧阴离子自由基能力基本持平，浓度在 300 nmol/L~400 nmol/L,对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除率为 35.1 %。400 nmol/L 浓度下,槲皮素脂质过氧化

抑制率为27.7 %。初步可得槲皮素具有一定的抗氧化活性,且有良好的量效关系。

参考文献:

[1] 任小娜, 曾俊, 王玉涛. 黑果枸杞的植物化学成分及生物活性研究现状[J]. 食品工业, 2014, 35(11): 231–234

[2] 夏园园, 莫仁楠, 曲玮, 等. 黑果枸杞化学成分研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39(5): 351–356

[3] 张良, 张玉奎, 戴荣继,等.射干叶中黄酮碳苷类化合物的药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(4): 728–730

[4] 陈文,王湘君,张顺琦,等.响应面优化超声波辅助提取仙人掌花槲皮素[J].海南热带海洋学院学报,2018,25(5): 90–100

[5] 王相, 范帅帅, 曹文利,等.基于液质联用技术的酸枣叶中9种成分含量的同时测定[J]. 中药材,2018, 41(1): 148–151

[6] 陶磊,刘周阳,韩春梅,等.液质联用对重组胰高血糖素样肽–1–Fc融合蛋白中的制品相关蛋白进行定性定量分析[J].药物分析杂志,2018,38(11): 1899–1904

[7] 云少君,戴玥,延莎.β–胡萝卜素和植酸对胡麻油抗氧化活性的影响[J].山西农业大学学报(自然科学版),2015,35(3): 277–280

[8] 张明.几种体外抗氧化检测方法的评价研究[D].西安:陕西师范大学,2010: 5–7

[9] 孙丽萍, 王大仟, 张智武.11种天然植物提取物对DPPH自由基的清除作用[J]. 食品科学,2009, 30(1): 45–47

[10] Payet B, Shum C heong Sing A, Smadja J.Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays:determination of their polyphenolic and volatile constituents[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53(26): 10074–10079

[11] 孟庆焕, 王化, 王洪政,等.牡丹种皮黄酮提取及对ABTS自由基清除作用[J]. 植物研究,2013, 33(4): 504–507

[12] 胡贵丽,刘靖,刘勇强,等.博落回生物碱和茶籽多糖对黄羽肉鸡生长性能、血清生化指标及脂质过氧化的影响[J].动物营养学报,2018,30(11): 4626–4634

[13] 张良, 张玉奎, 戴荣继,等.射干叶中黄酮碳苷类的分离纯化与结构鉴定[J]. 北京理工大学学报,2010, 30(10): 1249–1251

收稿日期:2018–11–28

欢迎订阅2019年《食品研究与开发》

《食品研究与开发》是由天津市食品研究所有限公司和天津市食品工业生产力促进中心主办,国内外公开发行的食品专业科技期刊,1980年创刊,半月刊,采用国际流行开本大16开。其专业突出,内容丰富,印刷精美,是一本既有基础理论研究,又包括实用技术的刊物。本刊已被“万方数据库”、“中文科技期刊数据库”、《乌利希期刊指南》、美国《化学文摘》、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、英国《食品科技文摘》(FSTA)等知名媒体收录,并被列入“中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、RCCSE中国核心学术期刊(A)。主要栏目有:基础研究、应用技术、检测分析、生物工程、专题论述、食品机械等。

本刊国内统一刊号CN 12–1231/TS;国际刊号ISSN 1005–6521;邮发代号:6–197。全国各地邮局及本编辑部均可订阅。从本编辑部订阅全年刊物享八折优惠。2019年定价:30元/册,全年720元。

本编辑部常年办理邮购,订阅办法如下:

(1)邮局汇款。地址:天津市静海县静海经济开发区南区科技路9号;收款人:《食品研究与开发》编辑部;邮政编码:301600。

(2)银行汇款。开户银行:工商银行静海支行;行号:102110000863

账号:0302095119300204171;单位:天津市食品研究所有限公司。

《食品研究与开发》编辑部

www.tjfrad.com.cn

E–mail:tjfood@vip.163.com

电话(传真):022–59525671