

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90113

QuEChERS-UHPLC-MS/MS 法测定黑木耳中米酵菌酸残留量

Determination of bongkreikic acid in Auricularia auricular combined QuEChERS with UHPLC-MS/MS

黄永桥¹ 马 凯² 吴新文¹ 高 亮²

HUANG Yong-qiao¹ MA Kai² WU Xin-wen¹ GAO Liang²

简银池¹ 路 瑶² 杨昌彪²

JIAN Yin-chi¹ LU Yao² YANG Chang-biao²

(1. 贵州省检测技术研究应用中心, 贵州 贵阳 550014; 2. 贵州省分析测试研究院, 贵州 贵阳 550014)

(1. Guizhou Testing Technology Research and Application Center, Guiyang, Guizhou 550014, China;

2. Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang, Guizhou 550014, China)

摘要:目的:建立一种快速测定黑木耳中米酵菌酸残留量检测的 QuEChERS-UHPLC-MS/MS 方法。方法:利用加标样品对提取溶剂、提取时间、吸附剂种类及吸附剂量等参数进行优化,样品用 1% 氨水—甲醇提取,经 C₁₈ 吸附剂净化,采用电喷雾电离源负离子多反应监测模式分析,外标法定量。结果:样品在 4 min 内完成分析,米酵菌酸在质量浓度 0.50~10.00 ng/mL 内线性关系良好,相关系数(r)为 0.998 3,检出限(LOD)为 2 μ g/kg。在空白样品中添加低、中、高 3 个浓度水平的日内平均回收率为 74.4%~91.6% ($n=6$),日间平均回收率为 74.9%~89.4% ($n=3$),相对标准偏差(RSD)为 3.3%~9.2%。结论:该方法操作简单、快速、回收率优良,重复性好、检测限低于现有检测标准要求,可用于黑木耳中米酵菌酸含量的定性和定量分析。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱—串联质谱法; 黑木耳; 米酵菌酸

Abstract: **Objective:** A rapid method for determination of bongkreikic acid in Auricularia auricular was developed using QuEChERS in combination with UHPLC-MS/MS. **Methods:** In this study, Several important experimental parameters, including type

of extraction solvent, extraction time, adsorbent type and adsorbent dosage were effectively optimized using spiked samples. The sample were shaken with methanol containing 1% ammonia water, and then carried out by the C₁₈ adsorbent purification. **Results:** The bongkreikic acid was determined within 4 minutes by negative ion multiple reaction monitoring mode analysis and external standard method. The linear range was 0.05~10.00 ng/mL ($r>0.998\ 3$). The limit of detection (LOD) was 2 μ g/kg, respectively. The average recovery rate at different levels (low, medium and high) the intra-batch ($n=6$) was 74.4%~91.6%, the inter-batch ($n=3$) were 74.9%~89.4% with a RSD ranging from 3.3%~9.2%. **Conclusion:** The developed method shows simple, rapid, excellent recovery and stable repeatability, and the limit of detection lower than the existing detection standards. It is suitable for the effective detection of bongkreikic acid in Auricularia auricular samples.

Keywords: QuEChERS; UHPLC-MS/MS; Auricularia auricular; bongkreikic acid

米酵菌酸(Bongkreikic Acid)是椰毒假单胞菌属酵米面亚种产生的一种可以引起食物中毒的毒素,毒性较强,误食后会损坏人的脑、肝脏及肾等器官,严重者可致死亡^[1-2],其化学结构式如图 1 所示。

近年来,中国因米酵菌酸引起的食物中毒事件时有发生^[3-5]。黑木耳本身无毒,但长时间浸泡会变质滋生细菌、真菌等致病微生物,进而产生生物毒素(米酵菌酸),危害人体健康。目前,中国现行的相关标准中只规定了银耳中米酵菌酸含量 ≤ 0.25 mg/kg^[6-7],现行的米酵菌酸检测标准中检出限为 0.005 mg/kg^[8],且标准适用

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFC1601800);贵州省科技计划项目(编号:黔科合服企[2019]4001,黔科中引地[2021]4026);DNA 条形码食品安全检测平台项目(编号:GXYP-2018-002)

作者简介:黄永桥,男,贵州省检测技术研究应用中心工程师。

通信作者:杨昌彪(1984—),男,贵州省分析测试研究院副高级工程师,硕士。E-mail:cb-yang@gzata.cn

收稿日期:2021-10-25

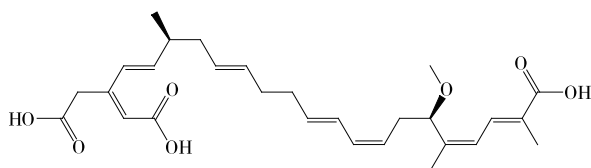


图 1 米酵菌酸的化学结构式

Figure 1 The chemical structure formula of bongrekic acid

范围为银耳及其制品、酵母面及其制品等食品,而黑木耳未在其检测范围内且限量不明确。

目前,有关米酵菌酸含量检测的方法有薄层色谱法^[9]、紫外分光光度法^[10]、高效液相色谱法^[11-12]、液相色谱—串联质谱法^[13-15]、高分辨质谱法^[16]。薄层色谱法和紫外分光光度法操作简单,但易受其他杂质的干扰;高效液相色谱法通用性强,但灵敏度低;液相色谱—串联质谱法因具有灵敏度高、抗干扰能力强等优点,被广泛用于痕量分析。而有关黑木耳中米酵菌酸含量的测定方法尚未见报道。QuEChERS法作为近年来新开发的一种快速、简便的前处理方法,被广泛用于农兽药残留及其他痕量化合物的测定^[17-20]。

研究拟以黑木耳为研究对象,采用 QuEChERS 净化方法,建立 QuEChERS 结合 UHPLC-MS/MS 仪快速测定黑木耳中米酵菌酸含量的检测方法,旨在为黑木耳的质量控制提供一种更加快速、简便的检测方法。

1 材料与方法

1.1 试验仪器和试剂

超高效液相色谱仪:Agilent 1290 型,配 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm),美国安捷伦科技有限公司;

三重四级杆串联质谱仪:6470 型,配有电喷雾离子源,美国安捷伦科技有限公司;

多管涡旋混合器:UMV-2 型,北京普立泰科公司;

纯水机:Milli-Q 型,美国 Millipore 公司;

陶瓷均质子:北京迪科马科技有限公司;

C₁₈ 吸附剂:40~63 μm,上海安谱实验科技股份有限公司;

无水硫酸镁:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

甲醇、乙腈:色谱级,德国 Merck 公司;

氨水:分析纯,山东西亚化工科技有限公司;

乙酸铵(质量分数 25%~28%):色谱纯,山东西亚化工科技有限公司;

米酵菌酸:≥95%,美国 Sigma 公司;

黑木耳:试验前于 30℃ 下恒温避光浸泡 48 h,市售。

1.2 标准溶液配制

1.2.1 标准储备液配制 将米酵菌酸标准品配制成

1.0 mg/mL 标准储备液,于-18℃ 避光保存。

1.2.2 基质工作曲线配制 将样品前处理后得到的空白基质提取液,分别配置成 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 10.00 ng/mL 基质标准工作液,现配现用。

1.3 色谱条件

柱温 35℃;进样量 5 μL;流动相 A 为 2 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 甲酸溶液),流动相 B 为乙腈;流速 0.3 mL/min;洗脱梯度:0.0~0.5 min, 10% B;0.5~1.5 min, 10%~85% B;1.5~2.0 min, 85% B;2.0~2.5 min, 85%~10% B;2.5~4.0 min, 10% B。

1.4 质谱条件

ESI 源;负离子扫描;MRM 扫描;毛细管电压 4.0 kV;雾化器压力 275.8 kPa;干燥气和鞘气流速 10 L/min;干燥气和鞘气温度 300℃;母离子 m/z 485.2, 锥孔电压 80 V, 定量离子 m/z 441.3, 碰撞能量 8 eV, 定性离子 m/z 397.3, 碰撞能量 18 eV。

1.5 样品前处理

称取浸泡粉碎后的试样 5.00 g 于塑料离心管中,加入 10 mL 1% 氨水—甲醇溶液,涡旋振荡 10 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 2 mL 于预先加有 500 mg 无水硫酸镁和 50 mg C₁₈ 吸附剂的离心管中,涡旋 1 min, 5 000 r/min 离心 2 min, 取上层清液过膜,待测。

1.6 方法学评价

1.6.1 基质效应 采用基质标准曲线和纯溶剂标准曲线,并按式(1)计算基质效应(ME)。

$$M_E = [(k_1/k_2) - 1] \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

M_E ——基质效应, %;

k_1 ——基质匹配标准曲线斜率;

k_2 ——纯溶剂标准曲线斜率。

通常 $M_E > 0\%$ 为基质增强效应; $M_E < 0\%$ 为基质抑制效应。当 $|M_E| \leq 10\%$ 时,可忽略不计;当 $|M_E|$ 为 10%~20% 时,存在较弱的基质效应;当 $|M_E| > 20\%$ 时,存在强基质效应^[21]。

1.6.2 检出限及定量限 通过在阴性样品中添加标准溶液来考察方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)。

1.6.3 回收率及精密度 选取阴性样品进行加标回收试验,添加水平分别为 2, 4, 10 μg/kg, 每个水平重复 6 次, 计算回收率和精密度。

1.6.4 数据处理 采用 Excel 2016 软件对数据进行处理,使用 Origin 2018 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

米酵菌酸结构式中含有 3 个羧基(—COOH),酸性较强,当采用乙腈—水作为流动相时,其峰形、响应值和

分类效果均优于甲醇—水。当在水相中加入 2 mmol/L 乙酸铵时,其峰形得到明显改善,因此,选择乙腈—0.1% 甲酸(含 2 mmol/L 乙酸铵溶液)作为流动相,采用梯度条件洗脱。

2.2 质谱条件优化

采用接双通的方式,用 100 μg/L 的标准溶液进样优化分析,在负离子模式下使用一级全扫描得 m/z 为 485.2 的准分子离子($[M-H]^-$),通过优化锥孔电压进行二级质谱分析,得到 m/z 为 397.3,441.3 的特征碎片离子。

2.3 前处理条件优化

2.3.1 提取 选择乙腈、0.1% 甲酸—乙腈、1% 氨水—乙腈、甲醇、0.1% 甲酸—甲醇和 1% 氨水—甲醇作为提取溶剂,结果见图 2。由图 2 可知,当使用 1% 氨水—乙腈作提取溶剂时,米酵菌酸提取效率为 34.9%,明显低于其他几种溶剂;当使用乙腈、0.1% 甲酸—乙腈、甲醇和 0.1% 甲酸—甲醇作提取溶剂时,其提取效率相差较小,均<70%;当使用 1% 氨水—甲醇作提取溶剂时,其提取效率为 87.6%,高于其他几种提取溶剂,且满足要求。故选用 1% 氨水—甲醇作为提取溶剂。

2.3.2 净化 选择 C_{18} 吸附剂、PSA 吸附剂、GCB 吸附剂和 Oasis PRiME HLB 小柱进行考察,结果见图 3(a)。由图 3(a)可知,使用 PSA 和 GCB 吸附剂作净化材料时,目标物的吸附较多,回收率<20%;使用 C_{18} 吸附剂和 Oasis PRiME HLB 小柱时,回收率均满足要求,但 C_{18} 吸附剂的回收率略优于 Oasis PRiME HLB 小柱,且杂质干扰、基线噪声等优于 Oasis PRiME HLB 小柱。由图 3(b)可知,使用 50 mg C_{18} 吸附剂的回收率优于其他两种。因此,选择 50 mg C_{18} 吸附剂作为净化方法。

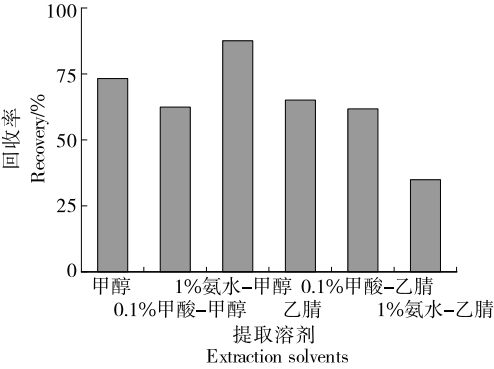


图 2 提取溶剂对米酵菌酸回收率的影响
Figure 2 Effects of different extraction solvents on the recovery of bongkrelic acid ($n=3$)

2.4 方法学评价

2.4.1 基质效应 由表 1 可知,基质效应为 21.8%,说明米酵菌酸在木耳基质中存在较强的基质增强效应,为减弱或消除基质效应对结果的影响,采用基质匹配标准曲线进行定量分析。

2.4.2 方法的标准曲线和检出限 由表 1 可知,米酵菌酸在 0.50~10.00 ng/mL 的质量浓度范围内,相关系数(r)为 0.998 3,线性关系良好,检出限为 2.0 μg/kg。

2.4.3 回收率及精密度 由表 2 可知,3 个添加水平的日内平均回收率为 74.4%~91.6%,日内相对标准偏差(RSD)为 6.0%~9.2%;日间平均回收率为 74.9%~89.4%,日间相对标准偏差(RSD)为 3.3%~4.3%。说明试验方法具有较好的重复性与准确性,可用于木耳中米酵菌酸残留量的定性、定量分析。

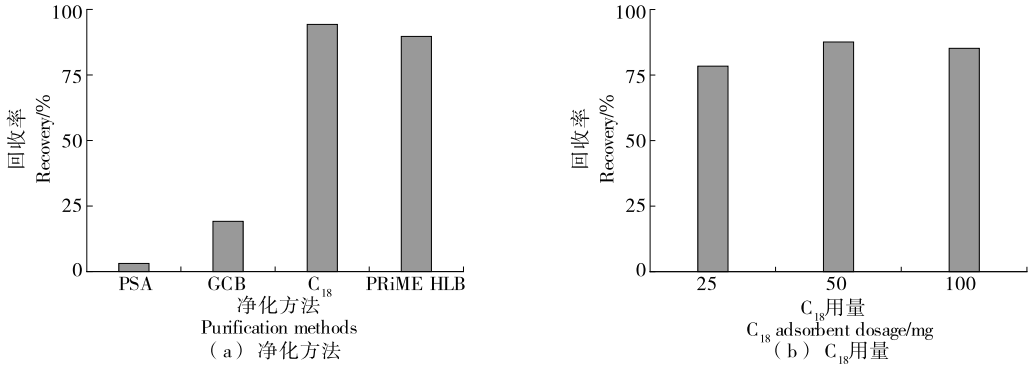


图 3 净化方法及 C_{18} 吸附剂用量对回收率的影响
Figure 3 Effects of different purification methods and the amount of C_{18} adsorbent dosage on recovery ($n=3$)

表 1 线性范围、线性方程、相关系数、检出限及基质效应

Table 1 Linear range, Linear equation, correlation coefficient (r), limits of detection (LOD) and matrix effects (ME) of bongkrelic acid

线性范围/(ng · mL ⁻¹)	线性方程	相关系数(r)	ME/%	检测限/(μg · kg ⁻¹)
0.50~10.00	$y=465.91x+36.49$	0.998 3	21.8	2.0

标准溶液、空白样品及加标样品的总离子流图如图 4 所示。

表 2 加标回收率和精密度

Table 2 Recoveries of standard addition and precisions of bongkrekkic acid

添加量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	日内 ($n=6$)		日间 ($n=3$)	
	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
2	74.4	6.0	74.9	4.3
4	82.5	9.2	80.3	3.3
10	91.6	8.6	89.4	3.8

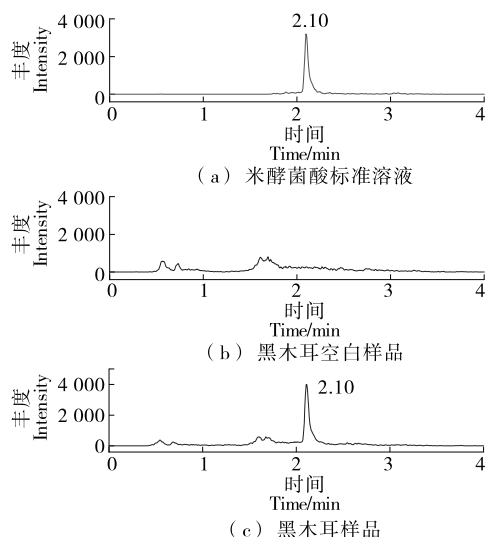


图 4 米酵菌酸标准溶液、黑木耳空白样品、黑木耳加标样品总离子流图

Figure 4 TIC chromatograms of standard solution, blank sample of auricularia auricular and bongkrekkic acid spiked sample of auricularia auricular

2.5 样品测定

按试验建立的方法对浸泡 48 h 后的 10 批次黑木耳进行测定,每个样品平行测定 2 次,结果均未检出米酵菌酸。由于试验是在冬季进行的,故未能反映不同季节环境条件对黑木耳浸泡的影响。

3 结论

建立了 QuEChERS 结合 UHPLC-MS/MS 法快速测定木耳中米酵菌酸残留量的检测方法,并对建立的方法进行方法学验证。结果表明,试验方法前处理简单、快速、灵敏度、精密度和分析准确性均满足相关要求,且方法检出限低于现有检测标准,单个样品分析时间为 4 min,能够快速、准确定性和定量分析木耳中米酵菌酸残留量,为日常监管提供技术支持。后续可研究黑木耳中产生米酵菌酸与浸泡时环境条件的关系,以揭示米酵

菌酸在浸泡过程中的产生机理。

参考文献

- [1] 胡文娟, 陈晓明, 王玉华, 等. 酵米面黄杆菌毒素 A 的提纯及鉴定[J]. 卫生研究, 1984(4): 34-37.
- [2] HU W J, CHEN X M, WANG Y H, et al. Purification and identification of Flavobacterium toxin A from fermented rice flour[J]. J Hyg Res, 1984(4): 34-37.
- [3] LI J H, ZHOU L U, LONG C Y, et al. An investigation of bongkrekkic acid poisoning caused by consumption of a nonfermented rice noodle product without noticeable signs of spoilage[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(10): 1 650-1 654.
- [4] 王海燕, 宋曼丹, 王建, 等. 广东省首起米粉米酵菌酸中毒病原菌鉴定研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(4): 100-104.
- [5] WANG H Y, SONG M D, WANG J, et al. Identification of the pathogen in rice noodles in relation to food poisoning caused by bongkrekkic acid in Guangdong Province[J]. Chin J Food Hyg, 2019, 31(4): 100-104.
- [6] 范璐, 杰杰. 云南省一例唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)食物中毒事件调查分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(23): 8 098-8 101.
- [7] FAN L, LUAN J. Investigation and analysis for an event of Burkholderia gladioli (Pseudomonas cocovenenans subtype Farino fermentans) food poison in Yunnan province[J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(23): 8 098-8 101.
- [8] 申屠平平, 朱珈慧, 徐小民, 等. 一起椰毒假单胞菌酵米面亚种引起的食物中毒调查[J]. 上海预防医学, 2019(6): 466-468.
- [9] SHENTU P P, ZHU J H, XU X M, et al. A food poisoning incident caused by pseudomonas cocovenenans subsp farinofermentans [J]. Shanghai J Prev Med, 2019(6): 466-468.
- [10] 中华人民共和国农业农村部. 绿色食品 食用菌: NY/T 749—2018[S]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- [11] Ministry of Agriculture and Rural Development of the People's Republic of China: Green food: Edible mushroom: NY/T 749—2018[S]. Beijing: China Agricultural Press, 2014.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食用菌及其制品: GB 7096—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [13] State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard: Edible Fungi and its products: GB 7096—2014[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.
- [14] 中华人民共和国国家食品药品监督管理总局, 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定: GB 5009.189—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [15] State Food and Drug Administration of the People's Republic of China, State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Food safety national standard: Determination of rice yeast acid in food safety national standard: GB 5009.

- 189—2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [9] 胡文娟, 陈晓明, 王玉华. 酵米面、银耳、玉米中黄杆菌毒素 A 的薄层及高压液相色谱测定法[J]. 卫生研究, 1986(2): 33-36.
- HU W J, CHEN X M, WANG Y H. Determination of flavotoxin A in fermented rice flour, tremella fuciformis and corn by TLC and HPLC[J]. J Hyg Res, 1986(2): 33-36.
- [10] 王夏, 孟昭赫, 胡文娟, 等. 酵米面黄杆菌毒素 A 紫外分光光度测定法[J]. 卫生研究, 1986(3): 25-27.
- WANG X, MENG Z H, HU W J, et al. Determination of xanthobacterin A by UV Spectrophotometry[J]. J Hyg Res, 1986(3): 25-27.
- [11] 李红艳, 金燕飞, 黄海智, 等. 高效液相色谱—二极管阵列检测器结合固相萃取法快速测定食品中米酵菌酸残留[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 247-251.
- LI H Y, JIN Y F, HUANG H Z, et al. Fast determination of bongkreik acid in foods using mixed-mode weak anion exchange solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) [J]. Food Sci, 2016, 37(24): 247-251.
- [12] 侯佰立. 固相萃取—高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸残留[J]. 现代食品, 2019(9): 169-172.
- HOU B L. Fast determination of bongkreik acid in foods using solid phase extraction-high performance liquid chromatography[J]. Mod Food, 2019(9): 169-172.
- [13] 覃冬杰, 陈荣珍, 卢艺, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法测定柳州螺蛳粉中米酵菌酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(13): 4 273-4 278.
- QIN D J, CHEN R Z, LU Y, et al. Determination of bongkreik acid in Liuzhou river snails rice noodle by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(13): 4 273-4 278.
- [14] 曾令浩, 李思颖, 李文倩, 等. 高效液相色谱—串联质谱法快速检测银耳中的米酵菌酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(19): 6 538-6 541.
- ZENG L H, LI S Y, LI W Q, et al. Rapid determination of bongkreik acid in Tremella by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(19): 6 538-6 541.
- [15] 周鹏. 超高效液相色谱串联质谱法测定银耳中米酵菌酸[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(22): 123-126.
- ZHOU P. Determination of bongkreik acid in tremella fuciformis by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Res Dev, 2015, 36(22): 123-126.
- [16] 李红娜, 袁飞, 张辰阳, 等. 液相色谱和飞行时间质谱联用检测米酵菌酸[J]. 食品工业, 2018, 39(7): 319-323.
- LI H N, YUAN F, ZHANG C Y, et al. The research of detection of bongkreik acid (BA) by LC-ESI-TOF technology[J]. Food Ind, 2018, 39(7): 319-323.
- [17] 黄小波, 刘维平. 基于 QuEChERS 的 UHPLC-MS/MS 同时检测鸡蛋中 19 种农药残留量[J]. 食品与机械, 2021, 37(10): 56-60.
- HUANG X B, PAN X H. Simultaneous determination of 19 kinds of pesticide residues in eggs by UHPLC-MS/MS based on QuEChERS[J]. Food & Machinery, 2021, 37(10): 56-60.
- [18] 陈思敏, 林腾奕, 李南, 等. QuEChERS 结合气相色谱三重四极杆串联质谱法测定大白菜中 80 种农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(16): 82-93.
- CHEN S M, LIN T Y, LI N, et al. Detection of 80 pesticide residues in cabbage by QuEChERS combined with gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(16): 82-93.
- [19] ORSO D, FLORIANO L, RIBEIRO L C, et al. Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(6): 1 638-1 653.
- [20] 易守福, 梁锋, 何青科, 等. QuEChERS-气相色谱—三重四极杆质谱法同时测定黑茶中 10 种酰胺类除草剂残留[J]. 食品与机械, 2021, 37(8): 57-62.
- YI S F, LIANG F, HE Q K, et al. Simultaneous determination of 10 kinds of amide herbicide residues in dark tea by QuEChERS with gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Food & Machinery, 2021, 37(8): 57-62.
- [21] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱—串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. 质谱学报, 2011, 32(6): 321-332.
- WANG L Q, HE L M, ZENG Z L, et al. Progress in matrix effect of veterinary drug residues analysis by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2011, 32(6): 321-332.

(上接第 6 页)

- [28] 刘程玲, 胡煜莹, 王力翀, 等. 普鲁兰酶酶解处理红薯淀粉及其性质研究[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(2): 6-11.
- LIU C L, HU Y Y, WANG L X, et al. Study on the enzymatic hydrolysis of sweet potato starch by pullulanase and its properties[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(2): 6-11.
- [29] 李静. 不同损伤程度小麦淀粉糊化性质差异机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 12-30.
- LI J. Mechanism study of different pasting properties on wheat starch with different damage levels[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016: 12-30.
- [30] 谭深. 外加电场对微观传质过程与化学反应影响的分子模拟研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018: 1-3.
- TAN S. Molecular simulation studies of the impact of external electric fields on mass transfer and chemical reactions at the microscopic level[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018: 1-3.