

甲基硼酸衍生法测定丁四醇中的碳同位素

李黎¹ 汪午^{*1} 余应新¹ 郑柯文¹ 陈华山²

王德庆¹ 盛国英^{1,2} 傅家謨^{1,2}

¹(上海大学环境与化学工程学院环境污染与健康研究所, 上海 200072)

²(中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640)

摘要 对赤藻糖醇和苏阿糖醇进行甲基硼酸衍生化, 并对反应物和生成的环状硼酸酯衍生物进行稳定碳同位素测定。采用元素分析/同位素比质谱(EA/IRMS)对固体赤藻糖醇、苏阿糖醇、甲基硼酸的碳同位素的测定和气相色谱/燃烧同位素比质谱(GC/C/IRMS)对硼酸酯衍生物的同位素测定的结果表明, 当衍生化反应温度为60℃, 反应时间为60 min, 甲基硼酸和四醇化合物的摩尔比为10:1时, 通过反应物的同位素值及质量平衡关系计算而得的硼酸酯的¹³C数值和实际测定的产物的碳同位素之间的差异小于0.5‰, 在该衍生化反应过程中不存在同位素分馏。此外, 在GC/MS上, 对赤藻糖醇、苏阿糖醇、2甲基赤藻糖醇、2甲基苏阿糖醇的甲基硼酸酯衍生物进行确认, 为进一步对天然源气溶胶中的2甲基丁四醇进行稳定碳同位素分析提供实验基础。

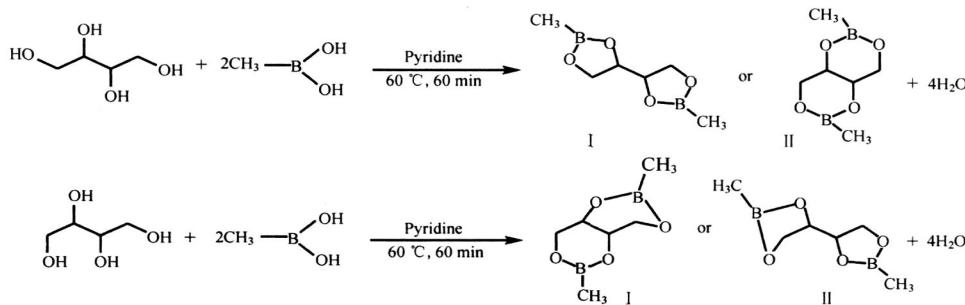
关键词 赤藻糖醇, 苏阿糖醇, 2甲基丁四醇, 甲基硼酸, 气相色谱/燃烧同位素比值质谱

1 引言

二次有机气溶胶(secondary organic aerosol, SOA)因对环境、气候和人体健康的影响, 正日益受到人们的关注^[1]。自从发现异戊二烯光氧化产物2甲基丁四醇对二次有机气溶胶的贡献以来^[2], 欧洲和美国的科学家们率先在匈牙利^[3]、德国^[4,5]、芬兰^[6,7]、美国^[8~12]和巴西^[13]对其进行了野外监测;最近, 又出现了关于我国森林地区大气细粒子中2甲基丁四醇的研究报道^[14]。

由于异戊二烯来源复杂, 有植物排放和人为排放, 而单体化合物同位素(compound-specific isotope analyses, CSA)技术可以说明化合物的来源和迁移转化机理。*N, O*双(三甲硅酰)三氟乙酰胺(*N, O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, BSTFA), 是一种很好的羟基衍生试剂, 可降低糖类、羧酸类化合物的挥发性, 使之能够被气相色谱分离;但由于产物中引入了大量的碳原子, 在同位素测定中造成较大误差。Dongen^[15]和Gross^[16]等较早采用甲基硼酸(MBA)+BSTFA对糖类化合物进行衍生并作气相色谱/燃烧同位素比值质谱(GC/C/IRMS)测定, 甲基硼酸衍生化反应快速便捷, MBA+BSTFA衍生化方法和以往的三甲基硅酰衍生化法及乙酰衍生化方法相比, 在原反应底物中引入的碳原子少, 获得的同位素值更精确。

本实验选择与2甲基丁四醇结构相似的丁四醇进行甲基硼酸衍生反应, 赤藻糖醇、苏阿糖醇甲基硼酸衍生化反应如下:



2008-08-12收稿; 2008-11-20接受

本文系国家自然科学基金(Na 20677036)、上海市重点学科项目(Na T105)和上海大学研究生创新基金(Na A. 16-0110-07-009)资助项目

* E-mail: wangwu@shu.edu.cn

采用元素分析/同位素比例质谱(EA/IRMS)测定赤藻糖醇、苏阿糖醇以及甲基硼酸的稳定碳同位素组成,并采用GC/C/IRMS对硼酸酯衍生物进行稳定碳同位素测定,通过反应物和产物的¹³C值的变化,研究该衍生化反应过程的同位素分馏效应。如果该过程没有发生同位素分馏,则可以推断,与赤藻糖醇、苏阿糖醇为同系物的2-甲基丁四醇在甲基硼酸衍生反应过程中也不会产生同位素分馏,该方法可用于大气气溶胶中2-甲基丁四醇的稳定碳同位素分析。

2 实验部分

2.1 实验试剂

MiliQ处理纯水,分析纯乙醇(国药)经3次蒸馏,分析纯苯(国药)经3次蒸馏,分析纯丙酮(国药)经3次蒸馏,赤藻糖醇(HPLC, 99%, Fluka)、赤藻糖醇(99%, Sigma)分别在水和乙醇的混合溶剂中重结晶3次;苏阿糖醇(D-Threitol, 99%, Aldrich),苏阿糖醇(D,L-Threitol, 97%, Aldrich)分别在乙醇中重结晶3次,甲基硼酸(ABCR, 97%)在苯和丙酮的混合溶剂中重结晶3次,无水吡啶(Acros Organics, 99%)。

2.2 实验方法

2.2.1 不同衍生化反应条件下硼酸酯衍生物的产率 分别取赤藻糖醇和D-苏阿糖醇各400 ng,以及2-甲基丁四醇(合成方法参照文献[17])400 ng于衍生化反应瓶中,柔和氮气将溶剂吹干,接着加入6 μg甲基硼酸,加入无水吡啶定容到40 μL,研究不同的衍生化温度和衍生化反应时间对硼酸酯的产率的影响。

保持赤藻糖醇、D-苏阿糖醇以及2-甲基丁四醇质量不变,采用不同质量浓度的甲基硼酸进行衍生化反应,甲基硼酸与四醇化合物的摩尔比分别为2:1、4:1、6:1、10:1和14:1,研究不同甲基硼酸用量下,硼酸酯的产率。

2.2.2 GC/MS条件 GC/MS采用Agilent GC6890-MS5975联用系统。硼酸酯分析条件为:进样口温度250℃,色谱柱DB-5MS柱(J & W Scientific, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm),起始温度为50℃(5 min)
 $\frac{3 \text{ /min}}{80} \quad \frac{1 \text{ /min}}{90} \quad \frac{50 \text{ /min}}{290}$ (5 min)。载气流速1.0 mL/min。离子源温度150℃,电子倍增管电压1282 V,质谱检测器温度:230℃,检测范围:40~400 amu。

2.2.3 稳定碳同位素的测定 EALMS系统由CE EA1112C/N/S质谱仪(Thermo Finnigan MAT),Conflo连接器及DELTApplus XL MS组成。氧化炉和还原炉温分别设定为900℃和650℃,每批样品测定前后均采用碳黑(¹³C = -36.91‰)作为标样进行校准,碳黑同位素组成值和标准数值的偏差为±0.2‰。固体样品在测定前均均匀碾细,密封在锡舟中进行测定,每个样本平行测定6次。

GC/C/IRMS测定系统采用Agilent GC6890-GV Isoprime MS联用系统,DB-5MS柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, J & W Scientific),燃烧炉温度870℃,连接界面温度290℃,氦气流速1.5 mL/min,进样口温度250℃。升温程序如下:起始温度50℃(2 min)
 $\frac{4 \text{ /min}}{50 \text{ /min}} \quad 110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min)
 $\frac{50 \text{ /min}}{290 \text{ }^{\circ}\text{C}}$ (5 min)。在升温程序的开始及结果阶段,依次平行进相同的5个CO₂标气,测定过程采用十正烷烃同位素标样(Indiana University)和自制的赤藻糖醇甲基硼酸酯和苏阿糖醇甲基硼酸酯标样对仪器进行校准,各烷烃测定同位素值和标准值的偏差小于0.5‰。不分流进样,进样量1 μL。每个样本平行测定3次。

3 结果与讨论

3.1 不同衍生化反应条件下衍生化产物的比较

不同衍生化温度和时间的实验结果显示,硼酸酯的产率在80℃条件下略高于60℃,在开始的15 min内,反应生成的硼酸酯的量增长最快,反应到60 min,已近饱和,结合不同衍生化反应的同位素测定结果(见表3),将衍生化反应的条件设定为60℃和60 min。不同的甲基硼酸用量的实验显示:当甲基硼酸与丁四醇的摩尔比为2:1时,反应不完全;当摩尔比从4:1逐步增长到6:1、10:1,硼酸酯的生成

量逐步增多,当摩尔比增长到 14:1时,生成的硼酸酯的量反而有所下降,峰形也相应变差。赤藻糖醇、苏阿糖醇、2甲基丁四醇甲基硼酸酯经色谱分离的总离子流图见图 1。

3.2 四醇甲基硼酸酯相对产率

根据赤藻糖醇甲基硼酸酯、苏阿糖醇甲基硼酸酯以及2甲基丁四醇甲基硼酸酯在 GC/MS 上出峰面积的大小比例确定甲基硼酸衍生化产物的相对产率。自行合成的2甲基丁四醇中,2甲基赤藻糖醇和2甲基苏阿糖醇的质量比为 40:60。相对产率计算结果见表 1。

表 1 四醇甲基硼酸酯相对产率计算值

Table 1 Relative yields of tetrol methylboronates

化合物 Compound	赤藻糖醇 - 甲基硼酸酯 Erythritol - methylboronate (1+2)*	苏阿糖醇 - 甲基硼酸酯 Threitol methyl - boronate (5+6)	2赤藻糖醇 - 甲基硼酸酯 2-Methyl - erythritol - methylboronate (3+4)	2苏阿糖醇 - 甲基硼酸酯 2-Threitol - methylboronate (7)
相对产率 Relative yield	1	0.62	0.95	0.25

*: 1~7为峰的序号同图 1(peak number refer to that as in Fig 1)。1+2: 1,2两个峰面积相加获得总的赤藻糖醇甲基硼酸酯的峰面积 (peak area of erythritol methylboronate was calculated by the sum area of peak 1 and peak 2)。

3.3 衍生化反应过程中的同位素分馏现象讨论

3.3.1 同位素分馏现象讨论 实验采用两种同位素组成不同、不同厂家的赤藻糖醇和苏阿糖醇,在 60℃,60 min,甲基硼酸和丁四醇化合物的摩尔比为 10:1 的条件下进行衍生化反应,具体的测定结果见表 2。

表 2 衍生化反应过程中甲基硼酸酯 ^{13}C 计算值和测定值的比较

Table 2 Predicted and measured ^{13}C values of tetrol methylboronates in methylboronic acid (MBA) derivatization reaction

化合物 Compound	厂家规格 Specification	EA / IRMS ^b	^{13}C ^a		
			计算值 Calculated ^c	GC/C / IRMS 测量值 Found by GC/C / IRMS ^d	e
赤藻糖醇 Erythritol	Fluka, 99% Sigma, 99%	- 11.95 ± 0.19 - 12.80 ± 0.19	- 16.78 - 17.35	- 16.90 ± 0.26 - 17.19 ± 0.23	0.12 - 0.16
苏阿糖醇 Threitol	Aldrich, D-threitol, 99% Aldrich, D,L-threitol, 97%	- 27.05 ± 0.17 - 25.42 ± 0.10	- 26.85 - 25.76	- 26.75 ± 0.10 - 25.76 ± 0.17	- 0.10 - 0.20
甲基硼酸 MBA	ABCR, 97%	- 26.44 ± 0.06			

a 参照物为美国南卡罗来纳州白垩皮狄组拟箭石化石 (stable carbon isotopic compositions reported in permil relative to Pee Dee Belemnite (PDB)) ,单位 (unit): ‰; b EA / IRMS 测定的固体赤藻糖醇、苏阿糖醇、甲基硼酸的 ^{13}C 值 (^{13}C value of erythritol, threitol, MBA determined by EA / IRMS); c: 根据质量平衡方程 Eq1 和 EA / IRMS 测定的赤藻糖醇、苏阿糖醇、甲基硼酸 ^{13}C 值计算而得的甲基硼酸酯的 ^{13}C 值 (calculated ^{13}C value of tetrol methylboronates based on mass balance equation Eq1 and ^{13}C of erythritol, threitol, methylboronic acid determined by EA / IRMS); d GC/C / IRMS 测定的甲基硼酸酯的 ^{13}C 值 (^{13}C value of tetrol methylboronates determined by GC/C / IRMS); e 硼酸酯化合物 ^{13}C 测量值和理论计算值的偏差 (predicted ^{13}C - measured ^{13}C)。

四醇甲基硼酸酯 ^{13}C 计算公式如下:

$$^{13}\text{C}_{\text{boronate}} = f_{\text{MBA}} \cdot ^{13}\text{C}_{\text{MBA}} + f_{\text{tetritol}} \cdot ^{13}\text{C}_{\text{tetritol}} \quad (1)$$

公式中, f_{MBA} , f_{tetritol} 分别为衍生产物中来自甲基硼酸及四醇化合物的碳原子数占产物硼酸酯分子中碳原子总数的比例。在丁四醇衍生化反应过程中, $f_{\text{MBA}} = 1/3$, $f_{\text{tetritol}} = 2/3$ 。从表 2 的测定结果可以看到:

^{13}C 测量值和理论计算值的偏差均小于 0.5‰, 此结果在同位素测定技术的允许误差范围之内, 说明在赤藻糖醇、苏阿糖醇甲基硼酸衍生化反应过程中, 没有同位素分馏现象发生。

3.3.2 最优化的衍生化条件 对在不同衍生化反应时间、温度下, 测定了赤藻糖醇甲基硼酸酯、苏阿糖醇甲基硼酸酯 ^{13}C 值 (见表 3)。实验结果表明, 当衍生化反应温度为 60℃, 反应时间为 60 min 时, ^{13}C 测定值和理论计算值最接近, 该衍生化反应条件最适于 ^{13}C 值的测定。

3.3.3 GC/C / IRMS 分离图谱 赤藻糖醇、苏阿糖醇甲基硼酸酯在 GC/C / IRMS 上的分离图谱见图 2。

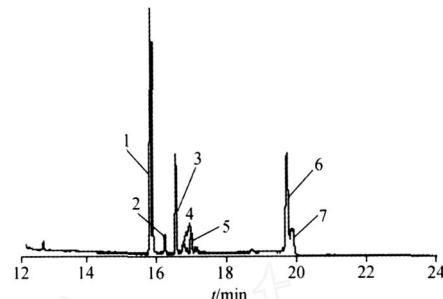


图 1 四醇硼酸酯衍生物 GC 分离总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of tetrol methylboronates

1. 赤藻糖醇甲基硼酸酯 (erythritol methylboronate, EMB);
2. 赤藻糖醇甲基硼酸酯 (erythritol methylboronate, EMB);
3. 2甲基赤藻糖醇甲基硼酸酯 (2-methylerythritol methylboronate, 2-MEMB);
4. 2甲基赤藻糖醇甲基硼酸酯 (2-methylerythritol methylboronate, 2-MEMB);
5. 苏阿糖醇甲基硼酸酯 (Threitol methylboronate, TMB);
6. 苏阿糖醇甲基硼酸酯 (Threitol methylboronate, TMB);
7. 2甲基苏阿糖醇甲基硼酸酯 (2-methylthreitol methylboronate, 2-MTMB)。

表3 不同衍生化反应时间、温度下,甲基硼酸酯¹³C测定值Table 3 Determination of ¹³C of methylboronates under different derivatization temperature and different derivatization time

化合物 Compound	衍生化反应条件 Derivatization condition	¹³ C ^{a,b}			
		15 min	30 min	60 min	90 min
赤藻糖醇甲基硼酸酯 ^c Erythritol methylboronate	T = 60 , n _{MBA} / n _{tetrol} = 10 / 1	- 18.03 ± 0.72	- 18.03 ± 0.50	- 17.20 ± 0.57	- 16.51 ± 0.26
	T = 80 , n _{MBA} / n _{tetrol} = 10 / 1	- 18.45 ± 0.09	- 18.40 ± 0.11	- 17.60 ± 0.34	- 17.65 ± 0.72
苏阿糖醇甲基硼酸酯 ^d Threitol methylboronate	T = 60 , n _{MBA} / n _{tetrol} = 10 / 1	- 27.71 ± 0.02	- 26.91 ± 0.80	- 26.58 ± 0.61	- 26.95 ± 0.24
	T = 80 , n _{MBA} / n _{tetrol} = 10 / 1	- 28.61 ± 0.93	- 27.02 ± 0.01	- 26.30 ± 0.77	- 27.39 ± 0.44

a 参照物为美国南卡罗来纳州白垩皮狄组拟箭石化石 (stable carbon isotopic compositions reported in permil relative to Pee Dee Belemnite (PDB)) , 单位 (unit) : ‰ ; b GC/C/IRMS 测定甲基硼酸酯的 ¹³C 值 (¹³C value of tetrol methylboronates determined by GC/C/IRMS) ; c 赤藻糖醇 (fluka, 99%) 和甲基硼酸 (ABCR, 97%) 反应生成赤藻糖醇甲基硼酸酯, 计算其 ¹³C 值为 - 16.78‰ (calculated ¹³C of erythritol methylboronate, resultant of erythritol (fluka, 99%) reacted with methylboronic acid (ABCR, 97%), was - 16.78‰) ; d D 苏阿糖醇 (Aldrich, 99%) 和甲基硼酸 (ABCR, 97%) 反应生成苏阿糖醇甲基硼酸酯, 计算其 ¹³C 值为 - 26.85‰ (calculated ¹³C of erythritol methylboronate, resultant of D-threitol (Aldrich, 99%) reacted with methylboronic acid (ABCR, 97%), was - 26.85‰)。

从图 2 可以看到, 赤藻糖醇甲基硼酸酯 和赤藻糖醇甲基硼酸酯 在 GC/C/IRMS 色谱柱上的出峰顺序比例和 GC/MS 上表现类似, 苏阿糖醇甲基硼酸酯同样呈现 和 型两个峰, 这两个峰的单体稳定碳同位素值非常接近。本实验提供的赤藻糖醇甲基硼酸酯和苏阿糖醇甲基硼酸酯的数据分别将 和 型两个峰合并计算。

根据瑞利关于化学反应过程中同位素效应的讨论, 认为在决定反应速率的关键步骤中, 如果和碳原子相连的化学键发生断裂或生成, 此时的同位素效应是最重要的^[18]。赤藻糖醇和苏阿糖醇的甲基硼酸衍生化反应过程中, 环状硼酸酯产物的环封闭和脱除水分子的过程是迅速的。本研究中甲基硼酸过量, 在决定反应速率的步骤中, 没有连接碳原子的化学键的断裂和生成。经实验证, 虽然赤藻糖醇甲基硼酸酯和苏阿糖醇甲基硼酸酯的生成产率有所不同, 但在该衍生化反应过程中, 均没有同位素分馏现象产生。

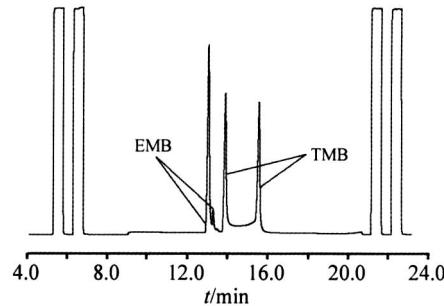


图2 赤藻糖醇甲基硼酸酯(EMB)、苏阿糖醇甲基硼酸酯(TMB)GC/C/IRMS分离图谱

Fig 2 GC/C/isotope ratio mass spectrometric (IRMS) chromatogram of erythritol methylboronate (EMB) and threitol methylboronate (TMB)

References

- Wang Wu (汪午), Wang Sheng-Liang (王省良), Li Li (李黎), Zhang Dong-Ping (张东平), Wang Yang-Jun (王扬君), Sheng Guo-Ying (盛国英), Fu Jia-Mo (傅家模). *Geochimica* (地球化学), 2008, 37(1): 77 ~ 86
- Claeys M, Graham B, Vas G, Wang W, Vermeulen R, Pashynska V, Cafmeyer J, Guyon P, Andreae M O, Artaxo P, Maenhaut W. *Science*, 2004, 303 (5661): 1173 ~ 1176
- Ion A C, Vermeulen R, Kourtchev I, Cafmeyer J, Chi X, Gelencsér Á, Maenhaut W, Claeys M. *Atmos. Chem. Phys.*, 2005, 5: 1805 ~ 1814
- Plewka A, Gnauk T, Brügmann E, Herrmann H. *Atmos. Environ.*, 2006, 40: S103 ~ S115
- Böge O, Miao Y, Plewka A, Herrmann H. *Atmos. Environ.*, 2006, 40 (14): 2501 ~ 2509
- Kourtchev I, Ruuskanen T, Maenhaut W, Kulnala M, Claeys M. *Atmos. Chem. Phys.*, 2005, 5: 2761 ~ 2770
- Kourtchev I, Ruuskanen T M, Keonen P, Sogacheva L, Dal Maso M, Reissell A, Chi X, Vermeulen R, Kulnala M, Maenhaut W, Claeys M. *Plant Biology*, 2008, 10: 138 ~ 149
- Edney E O, Kleindienst T E, Jaoui M, Lewandowski M, Offenberg J H, Wang W, Claeys M. *Atmos. Environ.*, 2005, 39 (29): 5281 ~ 5289
- Xia X Y, Hopke P K. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40 (22): 6934 ~ 6937
- Cahill T M, Seaman V Y, Charles M. J., Holzinger R, Goldstein A H. *J. Geophys. Res.*, 2006, D16312, doi: 10.1029/2006JD007178, 2006
- Clements A L, Seinfeld J H. *Atmos. Environ.*, 2007, 41: 825 ~ 1830
- Lewandowski M, Jaoui M, Kleindienst T E, Offenberg J H, Edney E O. *Atmos. Environ.*, 2007, 41: 4073 ~ 4083
- Schkolnik G, Falkovich A H, Rudich Y, Waenhuys W, Artaxo P. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39: 2744 ~ 2752

- 14 Wang W, Wu M H, Li L, Zhang T, Li H J, Wang Y J, Liu X D, Sheng G Y, Claeys M, Fu J M. *Atmos. Chem. Phys.*, 2008, 8: 12435~12460
- 15 van Dongen B E, Schouten S, Dansté S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001, 15(7): 496~500
- 16 Gross S, Glaser B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18(22): 2753~2764
- 17 Wang W, Vas G, Dommeis R, Loones K, Claeys M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18(16): 1787~1797
- 18 Yu Y X, Wen S, Feng Y L, Bi X H, Wang X M, Peng G A, Sheng G Y, Fu J M. *Anal. Chem.*, 2006, 78(4): 1206~1211

Determination of Stable Carbon Isotope in Tetrosols by Methylboronic Acid Derivatization

LILI¹, WANGWU^{*1}, YU Ying-Xin¹, ZHENG Ke-Wen¹, CHEN Hua-Shan², WANG De-Qing¹, SHENG Guo-Ying^{1,2}, FU Jia-Mo^{1,2}

¹(Research Institute of Environmental Pollution and Health, School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200072)

²(State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640)

Abstract Tetrosols including erythritol and threitol were derivatized by methylboronic acid (MBA), and the stable carbon isotopic compositions of reactants (tetrosols and MBA) and resultants (the ringed boronate derivatives) were determined. The ¹³C value of solid erythritol, threitol and MBA were measured by elemental analysis/isotope ratio mass spectrometry (EA / IRMS), the ¹³C value of methylboronate derivatives were measured by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS). Experimental results illustrated that when derivatization temperature was 60 °C, derivatization time was 60 min, the molar ratio of MBA to tetrosol was 10:1, the difference between ¹³C of methylboronate calculated by ¹³C of reactants and mass balance equation with determined ¹³C of methylboronate was less than 5%, there not existed isotopic fractionation in this derivatization reaction. Moreover, the structure of methylboronate derivatives of erythritol, threitol, 2-methylerythritol and 2-methylthreitol were discussed. These will provide the base for stable carbon isotopic determination of 2-methyltetrosols in natural aerosol.

Keywords Erythritol, threitol, 2-methyltetrosols, methylboronic acid, gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry

(Received 12 August 2008; accepted 20 November 2008)

《平面色谱方法及应用》(第二版)

平面色谱法是色谱分析方法中的一个分支,主要包括纸色谱法和薄层色谱法。平面色谱有别于各种柱形式的色谱方法。平面色谱法设备简单,操作方便,得到了广泛的应用,特别适合于中草药、中成药及一些含大量杂质的样品中微量成分的分离分析。

该书共分十三章:第一至七章为概论、滤纸及薄层板、点样、展开、展开剂、定位、定性与定量;第八章至十章为薄层扫描定量的影响因素及其方法学认证、荧光化技术与原位化学反应;第十一至十三章为纸色谱与薄层色谱的应用实例。在第一版基础上,新版本更新了部分内容,补充了近年来的研究新成果。

该书可供医药、环保、食品、化工、农业、司法等领域的科研人员、高等院校相关专业师生、质量检验与生产部门从事分离分析的工作人员学习参考。该书由何丽一编著,化学工业出版社出版,定价39.00元。