

## 柿种质资源叶片中黄酮和多酚含量多样性研究

傅建敏<sup>1,2</sup> 张嘉嘉<sup>1,2</sup> 李芳东<sup>1,2\*</sup>

(1. 国家林业局 泡桐研究开发中心, 郑州 450003;  
2. 中国林业科学研究院 经济林研究开发中心, 郑州 450003)

**摘要** 为比较柿种质资源间黄酮类化合物和多酚含量的多样性,对111份柿资源叶片中槲皮素、山奈酚、粗黄酮和多酚进行测定和分析。结果表明,柿种质资源间槲皮素、山奈酚、粗黄酮和多酚含量存在丰富的多样性;除槲皮素外,不同柿地域来源间山奈酚、粗黄酮和多酚均表现出显著( $P < 0.05$ )差异性,而不同柿类型间只有山奈酚显示出显著( $P < 0.05$ )差异性;聚类结果显示柿种质资源可分为四大类群,其中类群IV为黄酮类化合物和多酚高含量的柿种质资源类群,共有21份资源,其为柿资源的选育提供了宝贵的育种材料。

**关键词** 柿叶;黄酮;多酚;多样性

中图分类号 S 665.2 文章编号 1007-4333(2014)06-0134-06 文献标志码 A

## Diversity of flavonoids compounds and polyphenols in leaves of persimmon germplasm

FU Jian-min<sup>1,2</sup>, ZHANG Jia-jia<sup>1,2</sup>, LI Fang-dong<sup>1,2\*</sup>

(1. China Paulownia Research Center, Zhengzhou 450003, China;  
2. Non-timber Forest Research and Development Center of CAF, Zhengzhou 450003, Hennan, China)

**Abstract** The concentrations of quercetin, kaempferol, crude flavonoid and polyphenols in the leaves from 111 persimmon germplasmss were determined. The aim was to study the diversity of flavonoids and polyphenols in leaves of persimmon germplasm. The results indicated that there were abundant diversities in quercetin, kaempferol, crude flavonoid and polyphenols. The different leaves of geographical persimmon had significant amounts of kaempferol, crude flavonoid and polyphenols ( $P < 0.05$ ). However, the significant difference was only detected in the content of kaempferol from the leaves of different persimmon types ( $P < 0.05$ ). The result of cluster analysis showed that persimmon germplasms were divided into four groups. Twenty one germplasms in group IV had high contents of flavonoids and polyphenols, which could provide precious breeding materials for breeding persimmon germplasm.

**Key words** persimmon leaf; flavonoids; polyphenols; diversity

柿 (*Diospyros kaki* L.) 为柿科 (Ebenaceae) 柿属 (*Diospyros*) 植物,广泛分布在热带、亚热带和温带地区,我国柿属有64种和变种(型),其中尤以柿资源最为丰富,是我国南北各地普遍栽培的食用品种,约有1058份柿品种资源。柿叶、花、皮、根和蒂等均可入药或有可能成为药物,其中柿叶入药始见于《滇南本草》,谓“经霜叶敷臃疮”,为中国传统

的中药材<sup>[1]</sup>。柿叶味苦、性寒,有抗菌消炎、下气平喘、生津止渴、清热解毒、润肺强心、镇咳止血、抗癌防癌等作用,现代药理学研究表明,柿叶还有软化血管、降脂降压、抗氧化、止血、疗疮等多种功效<sup>[2]</sup>,柿叶中含有丰富的维生素C、芦丁、胆碱、黄酮苷、胡萝卜素、多种氨基酸及铁、锌、钙等对人体健康有益的营养成分<sup>[3]</sup>。目前为止,以柿叶为原料开发饮品、药

收稿日期:2014-02-25

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划课题研究任务合约(2013BAD14B05)

第一作者:傅建敏,副研究员,主要从事经济林育种与栽培研究,E-mail:fjm371@163.com

通讯作者:李芳东,研究员,博士生导师,主要从事经济林育种与栽培研究及农桐间作研究,E-mail:lifangdong66@163.com

品、化妆品、饲料、食品包装等领域的产业呈明显上升趋势。产品主要有配方中药风干叶、单方成药“脑心清片”、柿叶茶、柿叶饮料、美白祛斑化妆品、配方养殖饲料、日本寿司包装等<sup>[4]</sup>。

目前研究表明,不同(品)种植物资源间总黄酮和多酚含量存在显著的基因型差异<sup>[5]</sup>,关于柿种质资源叶片中维生素C含量变异幅度较大已有报道外<sup>[6]</sup>,而槲皮素、山奈酚、粗黄酮和多酚等柿叶有效成分却鲜有报道,且当前柿叶中黄酮和多酚主要研究方向为其抗氧化和药理作用<sup>[7]</sup>。柿资源叶片这一传统中药材的试验材料种类逾千种,且药材原料对药物有效成分的影响至关重要,而柿叶中主要有效成分为多酚和黄酮类化合物<sup>[2]</sup>。因此,本研究通过对111份柿资源叶片中槲皮素、山奈酚、粗黄酮和多酚的含量测定和分析,旨在研究柿(品)种槲皮素,山奈酚,粗黄酮和多酚含量的多样性,不同柿(品)种间含量的差异性,以期筛选出高含量优良育种资源,为更加充分利用我国丰富的柿叶资源,并为进一步研究和开发柿叶医药保健品提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

参试材料均采自中国林业科学研究院经济林研究开发中心原阳试验基地(34°55.30′~34°56.45′N, 113°46.24′~113°47.59′E),柿属资源圃3年生未结果的柿属(*Diospyros* L.)植物,其中包括金枣柿、油柿(*D. Oleifera* C)、浙江柿(*D. glaucifolia*)、美洲柿(*D. virginiana*)和君迁子(*D. lotus* L.)5份柿近缘种、10份野柿(*D. kaki* Thunb. Var. *silvestris* M)资源,96份具有代表性的柿(*D. kaki* L.)栽培品种,共计111份试验材料,其中所采用柿栽培品种资源我国典型的地理区域,也基本涵盖我国各地区主栽优良品种以及日本甜柿资源。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品处理

每份试验材料选取3~5株树,每株树随机采集枝条中部无病虫害的典型叶片,采集时间为2013年8月28日;低温冷藏保存带回实验室,60℃烘干后粉碎,并过60目筛。

#### 1.2.2 柿叶中槲皮素、山奈酚提取及含量的测定

采用HPLC法<sup>[8]</sup>,称取试样粉末3.0g加入甲醇-25%盐酸(4:1)90mL,90℃回流5h,放冷,摇匀过滤,置于100mL容量瓶中,甲醇定容,摇匀,过

0.45 μm 滤膜,即得供试品溶液;以甲醇溶液作为阴性对照溶液。采用Synchronis C18柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm),流动相为甲醇-0.4%磷酸(V:V=55:45),流速1.0 mL/min,检测波长360 nm,柱温30℃,进样量为10 μL。

配制20 μg/mL槲皮素和山奈酚标准品的甲醇溶液,依次进样5.0、10.0、15.0、20.0和25.0 μL标准溶液,分别重复3次,测定峰面积,得槲皮素和山奈酚标准曲线分别为 $y=4.1465x-0.1069$ ( $R^2=0.9995$ )和 $y=4.1709x-0.0935$ ( $R^2=0.9998$ )。

#### 1.2.3 柿叶粗黄酮和多酚提取及含量的测定

称取试样粉末2.0g加入60%乙醇溶液90mL,即料液比为1:45,95℃索氏提取5h,冷却过滤,定容100mL,备用。

粗黄酮的测定,采用三氯化铝显色法<sup>[9]</sup>,取200 μL样品溶液,加入5%AlCl<sub>3</sub>溶液1mL,再用无水乙醇定容至10mL,摇匀,静置15min后,在420nm处测定其吸光度。以芦丁作标准品代替样品作标准曲线,配制0.05mg/mL芦丁60%乙醇标准溶液,得到回归方程 $y=25.298x+0.0052$ , $R^2=0.9995$ 。样品中的粗黄酮以芦丁的含量表示,mg/g。

多酚的测定,采用Folin-Ciocalteu法<sup>[10]</sup>稍加改进。80 μL样品溶液,加1.42mL蒸馏水稀释,然后加1.5mL福林酚试剂,放置3min后,加入15%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液3.0mL。混合溶液放置3h后测A<sub>765nm</sub>。以没食子酸作标准品代替样品作标准曲线,得到回归方程 $y=11.468x+0.0872$ , $R^2=0.9989$ 。样品中的多酚以没食子酸的含量表示,mg/g。

### 1.3 数据处理与分析

采用SPSS20.0对柿资源叶片中槲皮素、山奈酚、粗黄酮和多酚含量进行平均值、标准差、变异系数等基本描述,并计算其多样性指数<sup>[11]</sup>和绘制分布直方图;对不同地域来源和不同柿类型间进行单因素方差分析和Duncan多重比较;同时采用组内欧式平方距离法对111份柿种质资源进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 柿资源叶片中黄酮和多酚含量的差异性及其分布特征

111份柿种质资源叶片中黄酮和多酚含量的均值、标准差、变异系数和极值等结果见表1。由

表1可知,柿资源叶片中黄酮和多酚含量的多样性指数较高,除粗黄酮的为1.959外,其他成分均在2.0以上,说明柿资源存在丰富的多样性。不同柿种质资源叶片中槲皮素、山奈酚、粗黄酮和多酚的变异系数和极差较大,表明柿资源叶片的黄酮和多酚含量存在明显的基因型差异。进一步分析柿种质资源黄酮和多酚含量的种质分布,结果

表明(图1),槲皮素、山奈酚、粗黄酮和多酚均符合正态分布,其中约89.19%种质资源的槲皮素含量在0.20~1.98 mg/g;约89.19%种质资源的山奈酚含量在0.53~1.99 mg/g;粗黄酮含量在15.29~24.99 mg/g种质资源占总资源的82.88%;多酚含量在10.39~64.93 mg/g种质资源占总资源的86.49%。

表1 柿种质资源叶片中黄酮和多酚含量差异性

Table 1 Diversity of flavonoids and polyphenols contents in leaves of persimmon germplasm

成分 Component	均值 Mean	标准差 STDEV	极小值 Minimum	极大值 Maximum	极差 Range	变异系数/% CV	多样性指数 SHDI
槲皮素	1.25	0.60	0.05	3.08	3.03	47.91	2.034
山奈酚	1.20	0.56	0.05	2.80	2.75	46.60	2.028
粗黄酮	19.62	4.15	8.93	35.42	26.49	21.14	1.959
多酚	37.52	19.88	5.62	95.44	89.82	52.99	2.030

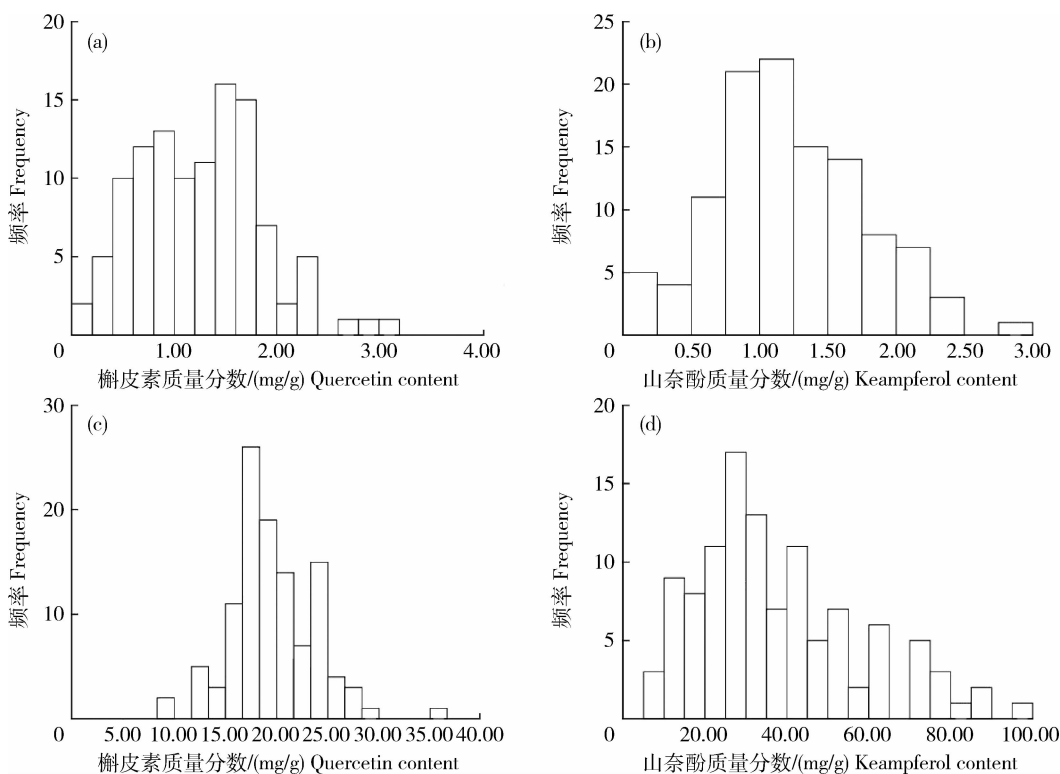


图1 柿种质资源叶片中黄酮类化合物和多酚含量分布

Fig. 1 Frequency distribution of flavonoids and polyphenols contents in leaves of persimmon germplasm

## 2.2 不同来源柿资源间黄酮和多酚含量分析

111份柿种质资源按照来源地被分成12个组群,方差分析及Duncan多重比较表明(表2)。除槲

皮素外,不同来源间山奈酚、粗黄酮和多酚含量均存在显著的差异性;虽然不同来源间槲皮素含量差异不显著,但仍存在一些差别,其中山西资源含量最低

(0.75 mg/g),仅为最高浙江资源的 46.9%;山奈酚含量最高的是我国江苏的品种,平均达到 1.83 mg/g ( $P<0.05$ )显著高于山西和两广地区,最低的山西品种,均值为 0.78 mg/g( $P<0.05$ )显著低于江苏地区;粗黄酮含量最高的江苏品种,均值为 26.94 mg/g,显著( $P<0.05$ )高于陕西、河南等 9 个地区的品种,并极

显著( $P<0.01$ )高于陕西、河南、河北以及国外地区,而国外柿资源的含量最低,仅有 19.18 mg/g;多酚含量最高的是两广地区,均值为 70.85 mg/g,显著高于陕西、河南、河北、浙江和陕西地区,并极显著( $P<0.01$ )高于陕西、河南和河北地区,且河北地区含量最低(29.52 mg/g)仅为两广地区的 41.7%。

表 2 柿资源不同来源间黄酮类化合物和多酚含量的比较

Table 2 Comparison of flavonoids and polyphenols contents of different geographical origin among persimmon germplasm

品种来源 Origin	槲皮素 Quercetin			山奈酚 Kaempferol			粗黄酮 Crude flavonoid			多酚 Polyphenol		
	均值±标准差	5%	1%	均值±标准差	5%	1%	均值±标准差	5%	1%	均值±标准差	5%	1%
	M±SD			M±SD			M±SD			M±SD		
陕西	1.15±0.49	a	A	1.09±0.45	ab	A	19.21±3.89	a	A	31.10±17.09	a	AB
河北	1.12±0.24	a	A	1.04±0.22	ab	A	18.62±2.88	a	A	29.52±3.10	a	A
河南	1.11±0.59	a	A	1.08±0.53	ab	A	18.32±3.60	a	A	32.96±18.36	a	AB
湖北	1.53±0.53	a	A	1.56±0.52	ab	A	19.55±2.18	a	AB	44.64±20.21	ab	ABC
湖南	1.23±0.28	a	A	1.33±0.34	ab	A	21.02±2.60	a	AB	48.65±24.85	ab	ABC
江苏	1.59±0.51	a	A	1.83±0.72	b	A	26.94±2.55	b	B	45.31±20.66	ab	ABC
浙江	1.60±0.89	a	A	1.16±0.75	ab	A	21.89±3.00	ab	AB	36.64±17.33	a	ABC
山东	1.35±0.62	a	A	1.34±0.65	ab	A	20.79±2.83	a	AB	66.17±26.60	b	BC
山西	0.75±0.36	a	A	0.78±0.44	a	A	21.49±4.11	ab	AB	38.98±7.84	a	ABC
两广地区	1.28±0.60	a	A	0.99±0.49	ab	A	21.47±3.50	ab	AB	70.85±21.67	b	C
闽台地区	1.57±0.66	a	A	1.62±0.49	ab	A	19.82±3.76	a	AB	45.66±11.09	ab	ABC
国外资源	1.36±0.67	a	A	1.35±0.60	ab	A	19.18±5.50	a	A	35.15±19.63	a	ABC

注:小写字母和大写字母分别表示在 5%和 1%水平上多重比较结果,同样的字母表示差异不显著。下表同。

Note:Letter (a~b, A~C) represent significantly different at  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ , values with the same letter were not significantly different according to Duncan test. The same below.

### 2.3 不同柿类型间黄酮和多酚含量分析

供试材料按柿类型分成柿近缘种、野柿、涩柿品种和甜柿品种 4 个类型,方差分析及 Duncan 多重比较表明(表 3)。柿叶中山奈酚含量与 4 种类型表现出极显著的差异性,柿近缘种含量最低,平均值为 0.26 mg/g,极显著( $P<0.01$ )低于其他 3 种类型。柿叶中槲皮素、粗黄酮和多酚含量与 4 种柿类型间未表现出显著的差异性,但仍存在一定的差别,如野柿的多酚含量比柿近缘种含量高,甜柿品种的槲皮素含量略高于柿近缘种。

### 2.4 柿资源叶片中黄酮和多酚含量的聚类分析

所测数据标准化后,采用组内欧式平方距离的系统聚类法,在遗传距离为 15 的水平,可将柿种质资源分为 4 个类群(图 2)。各类群的品质参数见表 4。类群 II 种质数量最多为 47 份,分别占总种质数的 42.3%,类群 I、类群 III 和类群 IV 数量相差无几,分别为 24、19 和 21 份。进一步研究发现,柿资源叶片中黄酮和多酚含量聚类结果与地域来源和柿类型无关。

表3 不同柿类型间黄酮类化合物及多酚含量比较

Table 3 Comparison of flavonoids and polyphenols contents of different types among persimmon germplasm mg/g

柿类型 Type	槲皮素 Quercetin			山奈酚 Kaempferol			粗黄酮 Crude flavonoid			多酚 Polyphenol		
	均值±标准差	5%	1%	均值±标准差	5%	1%	均值±标准差	5%	1%	均值±标准差	5%	1%
	M±SD			M±SD			M±SD			M±SD		
近缘种	1.02±1.18	a	A	0.26±0.34	a	A	20.55±9.48	a	A	25.98±21.72	a	A
野柿	1.20±0.57	a	A	1.45±0.63	b	B	21.21±5.09	a	A	42.54±22.11	a	A
涩柿品种	1.25±0.53	a	A	1.21±0.50	b	B	19.57±3.44	a	A	38.11±19.52	a	A
甜柿品种	1.43±0.74	a	A	1.40±0.57	b	B	18.26±4.06	a	A	35.32±19.85	a	A

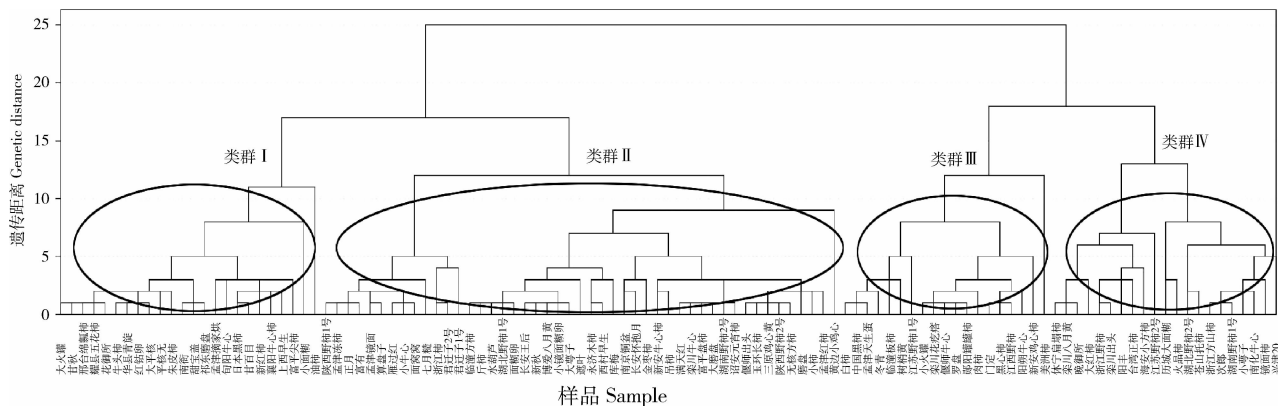


图2 柿种质资源黄酮类化合物及多酚聚类分析

Fig. 2 Clustering analysis diagram of persimmon germplasm by flavonoids and polyphenols

分析各类群各成分的均值和变异系数表明,类群 II 种质的槲皮素、山奈酚、粗黄酮和多酚含量均最低,并且变异系数最大;类群 IV 种质的槲皮素、山奈酚和粗黄酮和多酚含量均最高,除多酚外其他的变异系数

均最小;类群 I 种质的槲皮素、山奈酚较类群 III 偏高,且仅次于类群 IV;类群 III 种质的粗黄酮和多酚比类群 I 偏高,仅次于类群 IV。综合比较看,4 大类的优劣顺序为:类群 IV > 类群 III > 类群 I > 类群 II。

表4 柿种质资源品质分类

Table 4 Quality classification of persimmon germplasm

指标 Index	类群 Groups			
	类群 I	类群 II	类群 III	类群 IV
	Group I	Group II	Group III	Group IV
种质数	24	47	19	21
槲皮素	均值±标准差	1.65±0.48	0.81±0.42	1.16±0.35
	变异系数/%	28.94	51.78	29.79
山奈酚	均值±标准差	1.52±0.48	0.80±0.30	1.08±0.38
	变异系数/%	31.53	37.80	35.18
粗黄酮	均值±标准差	18.25±2.26	17.26±3.31	22.52±4.04
	变异系数/%	12.39	19.16	17.94
多酚	均值±标准差	30.51±7.05	24.21±14.06	52.85±8.43
	变异系数/%	23.12	58.09	15.95

### 3 结论与讨论

柿资源叶片中黄酮和多酚含量存在丰富的多样性,即不同柿(品)种间含量存在很大差异。Koh等<sup>[5]</sup>认为不同基因型对西兰花中槲皮素、山奈酚和多酚有显著的影响,费学谦等<sup>[12]</sup>认为不同柿种柿叶中维生素C和酚类物质存在丰富的变异,本研究也有此相同的结论。柿叶中黄酮类化合物和多酚含量与传统中药材中含量相当,甚至还要优于某些药材。本研究发现柿叶中槲皮素含量是金钱草的40多倍,山奈酚为金钱草的80多倍<sup>[13]</sup>,这与覃冬杰等<sup>[14]</sup>对柿叶的研究结果相一致。柿叶中的主要功效成分是黄酮类化合物,本研究发现柿叶中黄酮与枸杞和党参的含量相近,是白术的2倍左右<sup>[15]</sup>。Zhang等<sup>[15]</sup>对中国传统草药中多酚含量的研究发现,槐花中含量最高为91.33 mg/g,最低的半夏为1.09 mg/g,柿叶中多酚含量与黄芩和大黄含量相当。

除槲皮素外,柿叶中山奈酚、粗黄酮和多酚均与地域来源有关。谢皓等<sup>[16]</sup>对北京地区大豆异黄酮含量研究发现,来源地对黄豆黄素没有显著性影响,而大豆苷元和染料木素与来源地有极显著的相关性。本研究也得到相似的结论,即除槲皮素与地域来源为表现出显著的相关性外,来源地对山奈酚、粗黄酮和多酚均有显著性影响。柿叶中仅有山奈酚含量与4种类型表现出极显著的差异性,其他3种有效成分均为表现出相关性。费学谦等<sup>[12]</sup>研究发现柿资源野生种叶片中黄酮含量明显高于栽培种。本研究却发现只有山奈酚含量与柿资源类型有显著的相关性,且未表现出野生资源优于栽培资源,这可能与参试材料数量的差别和栽植地域的不同有关。进一步分析可知,不同类型柿资源变异系数较大,说明柿类型内部存在丰富的差异性。

此外,本试验对黄酮和多酚含量进行系统聚类分析,结果显示,柿资源叶片黄酮类化合物和多酚含量与地域来源和种质类型均无关。李颖睿等<sup>[17]</sup>对黄淮冬麦区小麦品种植酸含量与植酸酶活性聚类分析表明,其聚类结果与品种来源无必然联系,孙建等<sup>[18]</sup>对芝麻种质资源叶绿素含量聚类分析发现,聚类结果与种质类型没有明显的规律性,这均佐证了本研究的结果。本文采用系统聚类法将柿种质聚成4大族群,其中族群Ⅳ为黄酮类化合物和多酚高含量族群,共有21份柿种质资源,占总种质的18.92%,其中涩柿资源13份,甜柿资源4份,野柿

资源4份。族群Ⅳ中甜、涩柿资源所占比例较高,这些资源可发展为柿叶用林资源,为优良资源的选育提供了良好的试验材料。

### 参 考 文 献

- [1] 姜红波,赵卫星,冯国栋,等. 柿叶的主要有效成分及药理作用研究进展[J]. 化工时刊,2010(06):38-44
- [2] 董晓宁,陶蕾,赵强. 柿叶化学成分及药理作用研究进展[J]. 中兽医医药杂志,2011,23(3):25
- [3] 赵宁斌. 柿叶开发研究及其产业化生产[J]. 农村实用工程技术,2001(11):27-28
- [4] 傅建敏,梁晋军,周道顺. 柿叶有效成分研究综述[J]. 中南林业科技大学学报,2013,33(11):66-72
- [5] Koh E, Wimalasiri K M S, Chassy A W, et al. Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22(7):637-643
- [6] 卢涛,李明军,蒲飞,等. 柿资源叶片中抗坏血酸和谷胱甘肽含量的多样性研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2008, 36(7):45-50
- [7] Lijun Sun, Jianbao Zhang, Xiaoyun Lu, et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L) leaves [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(10):2689-2696
- [8] 黄瑞松,张鹏,梁子宁,等. 柿叶药材的鉴别及所含槲皮素和山奈素的测定[J]. 华西药学杂志,2013,(05):488-492
- [9] Stankovic M S, Niciforovic N, Topuzovic M, et al. Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L var *montanum*, f *supinum* (L) Reichenb [J]. Biotechnol, 2011, 25:2222-2227
- [10] Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, et al. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds [J]. Food Chemistry, 2006, 97(4):654-660
- [11] 董玉琛,曹永生,张学勇,等. 中国普通小麦初选核心种质的产生[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(1):1-8
- [12] 费学谦,周立红,龚榜初. 不同柿种柿叶维生素C和酚类物质的差异[J]. 林业科学研究,2004(05):616-622
- [13] 廖明冬,张晓春. HPLC法同时测定金钱草中槲皮素,槲皮素-3-甲醚及山奈酚的含量[J]. 中国药师,2013,16(12):1856-1858
- [14] 覃冬杰,梁永红,黄瑞松,等. 壮药柿叶槲皮素和山奈素含量测定方法的建立[J]. 广西医学,2012(09):1133-1136
- [15] Zhang L, Ravipati A S, Koyyalamudi S R, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(23):12361-12367
- [16] 谢皓,南张杰,陈学珍. 北京地区不同大豆品种异黄酮含量比较研究[J]. 中国粮油学报,2009(5):25-30
- [17] 李颖睿,陈茹梅,阎俊,等. 黄淮冬麦区小麦品种植酸含量与植酸酶活性聚类分析[J]. 作物学报,2014,40(2):329-336
- [18] 孙建,刘红艳,赵应忠,等. 芝麻种质资源叶绿素含量的多样性分析[J]. 江西农业学报,2009,21(12):5-9