

BIẾN ĐỔI CHUYỂN HÓA THỨ CẤP CỦA CÂY XƯƠNG KHÍ (*Clinacanthus nutans*) VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC

Nguyễn Bình Linh Chi¹, Huỳnh Như Ý,
Nguyễn Phan Thục Quyên¹, Nguyễn Vĩnh Phú², Chế Thị Cẩm Hà^{*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

²Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

*Email: chethicamha@husc.edu.vn

Ngày nhận bài: 12/12/2025; ngày hoàn thành phản biện: 23/12/2025; ngày duyệt đăng: 13/01/2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá sự biến đổi mô học, chuyển hóa thứ cấp và hoạt tính sinh học của cây Xương khí (*Clinacanthus nutans*) ở hai giai đoạn cây 6 tháng tuổi và 2 năm tuổi nhằm xác định thời điểm thu hoạch tối ưu. Kết quả vi phẫu cho thấy mẫu cây 6 tháng tuổi chủ yếu là mô mềm, mức lignin hóa thấp, trong khi mẫu cây 2 năm hình thành rõ libe gỗ thứ cấp và quá trình hóa gỗ phát triển. Phân tích GC-MS cho thấy mẫu 6 tháng giàu flavonoid C-glycoside (vitexin, isovitexin, schaftoside), còn mẫu 2 năm tích lũy chủ yếu acid béo và sterol. Heatmap và PCA cho thấy sự phân tách chuyển hóa rõ rệt giữa hai giai đoạn. Về hoạt tính sinh học, mẫu 6 tháng có khả năng chống oxy hóa mạnh hơn ($IC_{50} = 7,25 \mu\text{g/mL}$ so với mẫu 2 năm ($IC_{50} = 8,46 \mu\text{g/mL}$) và xấp xỉ acid ascorbic. Hoạt tính kháng khuẩn của mẫu 6 tháng có hoạt lực mạnh, đặc biệt đối với *Pseudomonas aeruginosa* và *Streptococcus pyogenes*. Kết quả cho thấy giai đoạn 6 tháng tuổi là thời điểm thu hoạch tối ưu khi mục tiêu là nhóm Apigenin C-glycoside.

Từ khóa: *Clinacanthus nutans*; flavonoid C-glycoside; GC-MS; DPPH; hoạt tính kháng khuẩn; chuyển hóa thứ cấp.

1. MỞ ĐẦU

Nhiều nghiên cứu về giai đoạn sinh trưởng của cây thuốc đã ảnh hưởng đáng kể đến nồng độ và chất lượng hợp chất dược liệu. Cây xương khí (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau, họ Acanthaceae) là cây thuốc được sử dụng điều trị các bệnh viêm nhiễm, rối loạn da liễu và một số bệnh lý do virus. Chiết xuất từ cây *C. nutans* có chứa lượng lớn polyphenol và flavonoid C-glycoside, góp phần tạo nên hoạt tính chống oxy

hóa và giảm viêm [13], các dẫn xuất Apigenin C-glycoside có tác dụng điều hòa miễn dịch, hỗ trợ ức chế các phản ứng viêm và bảo vệ tế bào [10].

Hàm lượng hợp chất thứ cấp, đặc biệt flavonoid và polyphenol phụ thuộc đáng kể vào tuổi sinh trưởng và mức độ hóa mô cứng, cả hai yếu tố này đều điều chỉnh các con đường trao đổi chất chính, bao gồm cả con đường phenylpropanoid. Sự thay đổi theo tuổi sinh trưởng quyết định đáng kể đến hoạt tính sinh học của dược liệu [8]. Do đó, thời điểm thu hoạch thay đổi tùy theo đặc tính sinh lý của từng giai đoạn phát triển, dẫn đến các cấu hình chất chuyển hóa thứ cấp khác nhau giữa các giai đoạn sinh trưởng. Nghiên cứu này nhằm mục đích làm sáng tỏ mối quan hệ giữa giai đoạn sinh trưởng, biến đổi thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của *C. nutans* được trồng ở Huế, từ đó cung cấp cơ sở khoa học để xác định các giai đoạn sinh trưởng liên quan đến sự tích lũy cao hơn của apigenin C-glycoside (vitexin, isovitexin và schaftoside).

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thân lá cây *Clinacanthus nutans* được thu tại vùng đồi ở xã Bình Thành, thành phố Huế vào tháng 2/2025. Mẫu được ThS. Nguyễn Việt Thắng định danh và lưu giữ tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Phần trên mặt đất của cây được sử dụng cho nghiên cứu vi phẫu và sấy khô để làm nguyên liệu tạo cao chiết.

Các chủng vi khuẩn kiểm định có nguồn gốc từ Bệnh viện Trung ương Huế: *Enterococcus faecalis* (ATCC29212); *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) và *Proteus vulgaris*.

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 2/2025 đến tháng 10/2025.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm vi phẫu

Cắt thân cây bằng máy Leica RM2125 với độ dày 5 μm . Ngâm Javen nồng độ 30%/45 phút. Xử lý bằng acid acetic 5%. Nhuộm với Carmin 1,5%/30 phút và nhuộm đổi màu với Xanh methylene 0,5%. Rửa sạch và quan sát dưới kính hiển vi quang học.

2.2.2. Tạo cao chiết

Phần thân lá cây được rửa bằng nước sạch và sấy ở 37°C đến độ ẩm đạt 6-7%, nghiền nhỏ bằng máy nghiền IKA, tốc độ máy 34.000 vòng/phút. Bột dược liệu được ngâm trong ethanol 70% (v/v) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/10 (w/v). Sau đó, hỗn hợp được đánh siêu âm với tần số cố định là 40 kHz bằng máy rửa siêu âm gia nhiệt (Derui DR-MH30, Trung Quốc) ở 30°C trong thời gian 5 phút. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman số 1 và tiến hành cô đuổi dung môi thu lấy cao chiết [5].

2.2.3. Phân tích thành phần các hợp chất hoá học bằng sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS

Cao chiết được phân tích bằng kỹ thuật sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS). Cao chiết *C. nutans* theo độ tuổi của cây được hòa tan trong ethanol tuyệt đối ở nồng độ 1 mg/mL, lọc qua màng PTFE 0.45 μm trước khi phân tích. Thí nghiệm thực hiện trên hệ thống GC-MS Agilent Technologies GC 7890A ghép nối với đầu dò MS 5975C. Cột mao quản DB-XXLB (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm). Khí mang heli (độ tinh khiết $\geq 99.99\%$) vận hành ở chế độ đẳng dòng, tốc độ 1 ml/phút, tỉ lệ chia dòng 100:1. Nhiệt độ buồng tiêm 250°C. Chương trình nhiệt: 40°C (giữ 2 phút), tăng 20°C/phút đến 140°C (giữ 5 phút), sau đó tăng 4°C/phút đến 270°C. Các thông số khối phổ: nhiệt độ nguồn ion hóa 230°C, năng lượng ion hóa 70 eV, dòng phát xạ 40 mA, phạm vi quét m/z 35–450 amu. Các hợp chất được định danh và đối chiếu phổ khối với thư viện NIST.

2.2.4. Phân tích dữ liệu chuyển hoá và xây dựng bản đồ nhiệt

Dữ liệu hàm lượng tương đối của các hợp chất thu được từ GC-MS được xử lý theo quy trình phân tích chuyển hóa của Xia J., 2015 [12]. Trước khi xây dựng bản đồ nhiệt, toàn bộ dữ liệu được chuẩn hóa bằng Z-score nhằm giảm sự chênh lệch tuyệt đối giữa các hợp chất và làm nổi bật xu hướng biến đổi đặc trưng của từng giai đoạn sinh trưởng. Phân tích phân cụm hai chiều được thực hiện theo phương pháp phân cụm phân cấp sử dụng khoảng cách Euclid và phương pháp liên kết Ward.D2. Thuật toán này được Jasmine [3] khuyến nghị trong xử lý dữ liệu metabolomics vì khả năng phân tách nhóm rõ ràng, phù hợp với đặc điểm dữ liệu hóa chuyển hóa thực vật.

Bản đồ nhiệt (heatmap) và phân tích thành phần chính (PCA) được thực hiện bằng phần mềm R phiên bản 6.3.1 với các gói pheatmap, FactoMineR và factoextra. Chỉ những hợp chất xuất hiện ổn định ở ≥ 2 phép lặp và có sai số phân tích thấp mới được giữ lại để đảm bảo độ tin cậy của mô hình và giảm nhiễu trong phân tích.

2.2.5. Phân tích thành phần chính

Phân tích thành phần chính (PCA) được sử dụng nhằm đánh giá sự khác biệt tổng thể giữa hai giai đoạn sinh trưởng và xác định các hợp chất có mức độ đóng góp lớn nhất vào sự phân tách này. Dữ liệu đầu vào gồm danh sách các hợp chất cùng hàm lượng tương đối, được chuẩn hóa theo quy trình xử lý của Worley B. và cộng sự [11]. PCA được thực hiện bằng phần mềm R hoặc MetaboAnalyst 5.0, dựa trên thuật toán phân rã giá trị suy biến (SVD). Hai thành phần chính PC1 và PC2 được dùng để mô tả sự phân tách giữa hai giai đoạn sinh trưởng của cây, trong khi biểu đồ tải trọng (loading plot) hỗ trợ xác định những hợp chất có đóng góp mạnh nhất vào mô hình. Các hợp chất có giá trị loading cao được xem là dấu ấn chuyển hóa đặc trưng cho từng giai đoạn sinh trưởng (cây 6 tháng hoặc 2 năm tuổi).

Độ tin cậy của mô hình PCA được đánh giá thông qua biểu đồ scree plot và tổng phương sai tích lũy theo Xia J. và cộng sự [12]. Các tiêu chí này giúp bảo đảm mô hình

phản ánh đúng cấu trúc dữ liệu và tránh hiện tượng nhiễu trong phân tích đa biến.

2.2.6. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết

Hoạt tính kháng khuẩn được tiến hành theo phương pháp của Vanden và Vlietlinck (1991). Bốn chủng vi sinh vật kiểm định gồm *Enterococcus faecalis* (ATCC29212); *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615) (Gram dương) và *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Proteus vulgaris* (Gram âm). Các chủng vi khuẩn kiểm định được nuôi cấy trong môi trường Luria Bertani broth đến khi đạt mật độ là 10^6 CFU. Lấy 0,1 mL dịch vi khuẩn, trải đều trên đĩa môi trường Tryptic Soy Agar. Các đĩa giấy thấm vô trùng (đường kính 6 mm) có chứa 20 μ L cao chiết ở các nồng độ 1000 mg/mL, 750 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL được đặt lên bề mặt đĩa đã dàn đều vi khuẩn. Các đĩa petri đặt ở 4°C trong 4 giờ, sau đó cho vào nuôi ở 35°C trong 24 giờ. Đĩa giấy kháng sinh ampicilin được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm là nước cất vô trùng. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết đối với các chủng vi khuẩn được đo bằng đường kính vòng vô khuẩn sau 24 giờ nuôi.

2.2.7. Đánh giá hoạt tính chống oxy hoá bằng thử nghiệm DPPH

Hoạt tính chống oxy hóa cao chiết *C. nutans* được đánh giá qua khả năng bắt gốc tự do DPPH theo TCVN 11939:2017, có điều chỉnh phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Dung dịch DPPH chuẩn bị ở nồng độ 100 μ M trong methanol và bảo quản trong tối. Cao chiết *C. nutans* và chất đối chứng ascorbic acid hòa tan trong methanol để thu dãy nồng độ 0,5; 2; 8; 32 và 128 μ g/mL. Hỗn hợp phản ứng gồm 1,0 ml dung dịch mẫu và 2,0 mL dung dịch DPPH 100 μ M, được lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, tránh ánh sáng. Mẫu trắng được chuẩn bị tương tự nhưng thay dung dịch mẫu bằng methanol. Sau thời gian ủ, độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 517 nm. Phần trăm bắt gốc DPPH được tính theo công thức:

$$\text{Khả năng bắt gốc DPPH (\%)} = \frac{\text{OD trắng} - \text{OD mẫu}}{\text{OD trắng}} \times 100$$

Giá trị IC_{50} được tính bằng phần mềm GraphPad Prism 9. Mỗi thí nghiệm được thực hiện ba lần lặp lại, kết quả biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình (\pm sai số chuẩn của ước lượng IC_{50}).

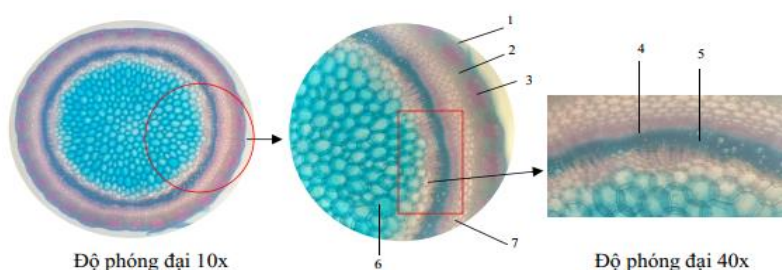
2.3. Thống kê và xử lý số liệu

Phân tích thành phần chính (PCA), phân tích bản đồ nhiệt cụm được thực hiện trên dữ liệu có liên quan bằng cách sử dụng phần mềm phân tích R 6.3.1 và Metabo Analyst 5.0. Các số liệu khác được xử lý bằng chương trình MS. Excel 2016.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

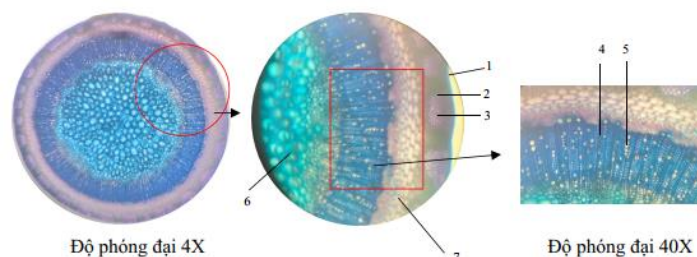
3.1. Đặc điểm vi phẫu

Trong nghiên cứu giải phẫu thực vật, việc quan sát vi phẫu thân ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau có ý nghĩa quan trọng nhằm làm rõ sự chuyển biến về cấu trúc, chức năng và mối liên hệ với hoạt động chuyển hóa. Sự khác biệt giữa giai đoạn 6 tháng và 2 năm tuổi không chỉ phản ánh tiến trình phát triển mô học mà còn liên quan chặt chẽ đến biến động thành phần hóa thực vật, đặc biệt là nhóm flavonoid C-glycoside như vitexin.



Hình 1. Cấu tạo vi phẫu mặt thân cây *C. nutans* thu giai đoạn 6 tháng tuổi

1. Biểu bì 2. Các đám cương mô 3. Nhu mô vỏ;
4. Mô mềm gỗ thứ cấp 5. Gỗ 6. Nhu mô ruột 7. Libe thứ cấp



Hình 2. Cấu tạo vi phẫu mặt thân cây *C. nutans* thu giai đoạn 2 năm tuổi

1. Biểu bì 2. Các đám cương mô 3. Nhu mô vỏ
4. Mô mềm gỗ thứ cấp 5. Gỗ 6. Nhu mô ruột 7. Libe thứ cấp

Quan sát vi phẫu cho thấy thân cây *C. nutans* 6 tháng tuổi mang đặc trưng sinh trưởng sơ cấp, với biểu bì một lớp, nhu mô vỏ thành mỏng, bó dẫn nhỏ phân bố thưa và lignin hóa chưa rõ rệt. Tỷ lệ mô mềm cao tạo điều kiện thuận lợi cho trao đổi chất và tích lũy hợp chất thứ cấp, đặc biệt là flavonoid. Với cây 2 năm tuổi, cấu trúc thân chuyển sang sinh trưởng thứ cấp với libe và gỗ thứ cấp phát triển, tia ruột và lignin hóa lan rộng. Sự gia tăng mô cứng phản ánh quá trình củng cố cơ học của thân và xu hướng ưu tiên tổng hợp các hợp chất phenolic cấu trúc như lignin hơn là flavonoid, phù hợp với mô hình chuyển hóa của thực vật trưởng thành [8]. Từ đó cho thấy thời điểm thu hoạch tối

ưu cây dược liệu không mang tính cố định, mà thay đổi đáng kể tùy thuộc vào đặc tính sinh lý của từng giai đoạn phát triển. Sự khác biệt về mức độ hóa mô cứng, cường độ trao đổi chất và định hướng chuyển hóa đặc biệt trong các nhánh của con đường phenylpropanoid khiến mỗi giai đoạn sinh trưởng tạo ra phổ hợp chất thứ cấp khác nhau. Xu hướng này tương đồng với kết quả của Abd Samat và cộng sự [1], khi hàm lượng phenolic và flavonoid tăng đến khoảng 16 tuần tuổi rồi giảm dần ở các giai đoạn muộn. Hiện tượng tương tự cũng được ghi nhận ở cây *Varronia curassavica* có α -pinene đạt cực đại ở 10 tháng trước khi giảm ở các giai đoạn sau [4]. Những bằng chứng này cho thấy tuổi sinh trưởng ảnh hưởng mạnh đến điều hòa chuyển hóa và sự thay đổi mô học giữ vai trò quan trọng trong việc quyết định hợp chất của cây.

3.2. Kết quả các thành phần hoá học có trong cây *C. nutans* bằng GC-MS

Kết quả xác định được sự khác biệt rõ rệt về thành phần hợp chất của *C. nutans* giữa hai giai đoạn cây 6 tháng tuổi và 2 năm tuổi (Bảng 1, 2). Tổng cộng 8 hợp chất chính được nhận diện ở cây 6 tháng tuổi và 13 hợp chất ở cây 2 năm tuổi, phân bố chủ yếu vào các nhóm: flavonoid C-glycoside, sterol, triterpenoid, acid béo và este acid béo.

Bảng 1. Các hợp chất có trong *C. nutans* ở cây 6 tháng tuổi

Peak	Name	R.time	Area	Area %
1	Apigenin	17.145	1050641	5.01
2	Phytol	17.589	374705	1.79
3	Vitexin	18.375	5207741	24.84
4	Isovitexin	25.910	3725243	17.77
5	Shaftoside	30.118	1380168	6.58
6	Stigmasterol	32.759	2553330	12.18
7	Clionasterol	34.103	4220815	20.14
8	Lupeyl acetate	36.191	2448413	11.68

Bảng 2. Các hợp chất có trong *C. nutans* ở cây 2 năm tuổi

Peak	Name	R.time	Area	Area %
1	N,N-Dimethylhomoserine lactone	8.329	37798615	1.7
2	Caprylic acid	8.979	34224889	1.54
3	Pentadecylic acid	18.561	425089568	19.09
4	Ethyl palmitate	18.716	235895587	10.06
5	Vitexin	20.318	1001626533	44.99

6	Ethyl stearate	20.574	47215485	2.12
7	2-Monopalmitin	23.215	140132358	6.29
8	1,1- dimethoxy decane	23.334	42247700	1.9
9	Isovitexin	27.791	42768241	1.92
10	α -Cedrene	29.929	35631510	1.6
11	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol	30.91	45135004	2.03
12	Stellasterol	32.005	80078838	3.6
13	γ -Ergosterol	33.259	58542234	2.63

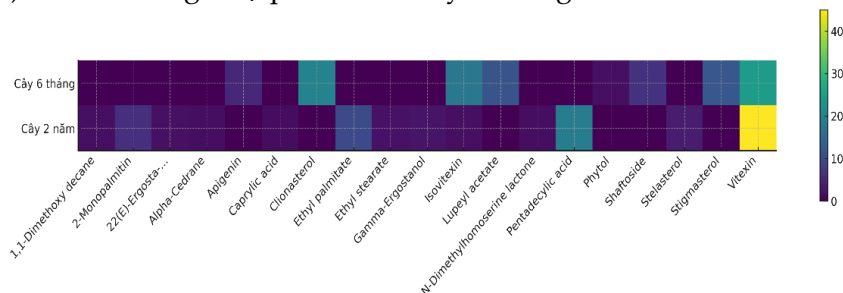
Ở cây 6 tháng tuổi: hợp chất chủ đạo là nhóm flavonoid C-glycoside, đặc biệt là vitexin cùng với isovitexin được thể hiện ở bảng 1. Sự tập trung cao của các hợp chất này phù hợp với đặc điểm sinh lý của cây non, khi các hoạt chất có cấu trúc đơn giản và có vai trò chống oxy hóa, kháng vi sinh vật và bảo vệ tế bào thường được ưu tiên sinh tổng hợp nhằm thích ứng nhanh với điều kiện môi trường [10].

Cây 2 năm tuổi: thành phần hóa học trở nên đa dạng thể hiện sự chuyển dịch chuyển hóa sang nhóm acid béo và este acid béo. Là dấu hiệu đặc trưng cho quá trình phát triển thứ cấp, khi cây chuyển dần từ ưu tiên tăng trưởng sơ cấp sang củng cố cấu trúc và tích lũy chất chuyển hóa thứ cấp ổn định hơn [1].

Sự khác biệt của hợp chất giữa hai giai đoạn sinh trưởng phản ánh sự điều hòa chuyển hóa theo tuổi cây, phù hợp với đặc điểm vi phẫu đã mô tả. Ở cây 6 tháng, mô mềm chiếm ưu thế và các enzyme trong con đường phenylpropanoid hoạt động mạnh, thuận lợi cho sinh tổng hợp flavonoid. Cây 2 năm tuổi, sự phát triển của mô gỗ libe và lignin hóa đi kèm với xu hướng tăng cường hợp chất lipid và sterol nhóm chất có vai trò cấu trúc và ổn định màng tế bào [9]. Điều này giải thích vì sao nhóm flavonoid chỉ còn giới hạn ở vitexin trong khi nhóm lipid tăng đáng kể.

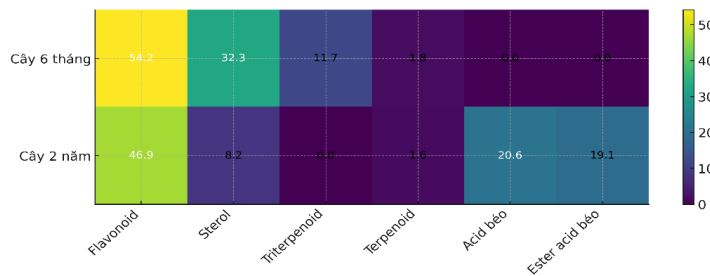
3.3. Phân tích bản đồ nhiệt và PCA làm rõ sự phân hóa chuyển hóa theo tuổi cây

Dữ liệu GC-MS sau chuẩn hóa Z-score được biểu diễn dưới dạng bản đồ nhiệt (Hình 3) nhằm đánh giá sự phân hóa chuyển hóa giữa hai nhóm tuổi.



Hình 3. Heatmap phân bố 21 hợp chất thứ cấp giữa mẫu 6 tháng và 2 năm

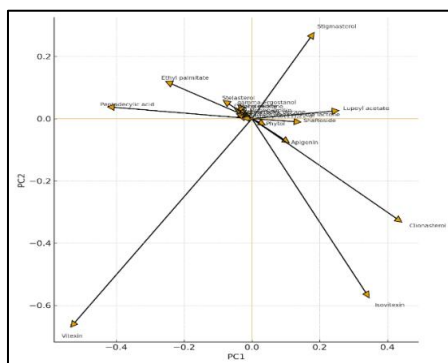
Kết quả cho thấy cây 6 tháng có tín hiệu mạnh ở các flavonoid C-glycoside như vitexin, isovitexin và shaftoside, phản ánh đặc trưng sinh lý của giai đoạn sinh trưởng sơ cấp, khi cây ưu tiên tổng hợp các hợp chất phenolic có vai trò phòng vệ. Ngược lại, cây 2 năm tuổi giảm cường độ flavonoid rõ rệt, trong khi các acid béo (pentadecylic acid, ethyl palmitate, ethyl stearate) và sterol (stellasterol, gamma-ergostanol) lại tăng mạnh. Sự chuyển dịch này phù hợp với xu hướng tái phân bố carbon từ con đường phenylpropanoid sang sinh tổng hợp acid béo sterol khi cây bước vào pha sinh trưởng thứ cấp nhằm củng cố cấu trúc mô và thành tế bào.



Hình 4. Heatmap sự phân bố các nhóm hợp chất giữa mẫu 6 tháng và 2 năm

Để làm rõ hơn biến động ở cấp nhóm hợp chất, bản đồ nhiệt theo phân loại hóa sinh (Hình 4) cho thấy cây 6 tháng có tỷ lệ flavonoid chiếm ưu thế tuyệt đối (54.2%), cao hơn đáng kể so với cây 2 năm (46.9%), trong khi sterol và acid béo lại chiếm tỷ lệ lớn hơn ở cây trưởng thành (20.6% và 19.1%). Tỷ lệ phần trăm này được tính dựa trên diện tích tín hiệu tương đối của các peak GC-MS, nhằm phản ánh sự phân bố tương đối của các nhóm chuyển hóa. Điều này củng cố nhận định rằng cây non duy trì cường độ tổng hợp flavonoid cao, trong khi cây 2 năm chuyển sang tích lũy các hợp chất cấu trúc, xu hướng thường gặp ở nhiều loài dược liệu, khi tuổi sinh trưởng ảnh hưởng trực tiếp đến sự điều tiết enzym trong con đường phenylpropanoid [8].

Phân tích thành phần chính (PCA) cũng cho thấy sự phân tách rõ ràng giữa hai nhóm tuổi. Trên mặt phẳng PC1-PC2, các flavonoid như vitexin, isovitexin và apigenin định vị cùng một phía và kéo điểm đại diện cho mẫu 6 tháng, trong khi các acid béo và sterol (clionasterol, ethyl palmitate, gamma-ergostanol) đóng góp mạnh theo hướng ngược lại, đặc trưng cho mẫu 2 năm tuổi. PC1 phản ánh biến thiên mạnh nhất liên quan đến nhóm flavonoid, trong khi PC2 biểu thị biến thiên thứ cấp chủ yếu do acid béo và sterol. Giá trị loading cao của các flavonoid cho thấy đây là nhóm hợp chất quyết định chính sự phân hóa chuyển hóa giữa hai giai đoạn.

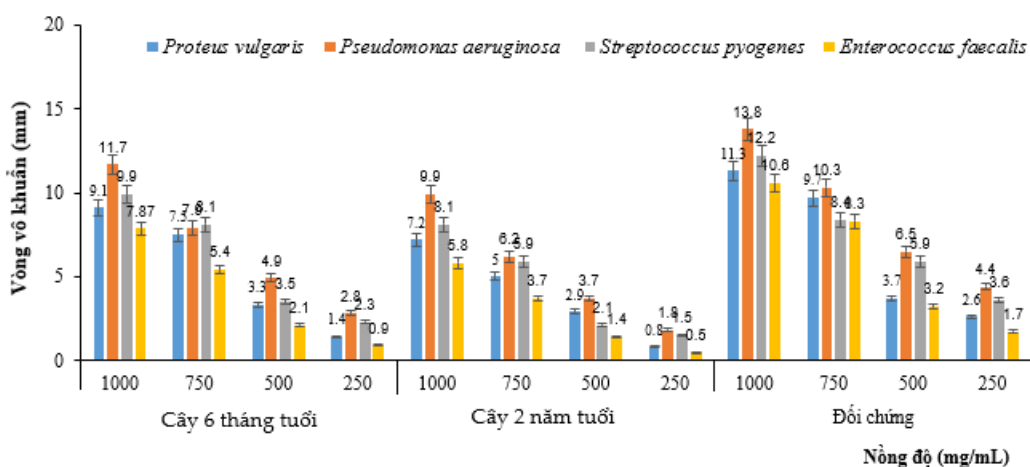


Hình 5. Biểu đồ tải PCA minh họa các chất chuyển hóa

Kết hợp heatmap và PCA cho thấy tuổi cây là yếu tố chi phối mạnh hồ sơ chuyển hóa của *C. nutans*. Đặc biệt, giai đoạn 6 tháng tuổi là thời điểm cây đạt hàm lượng flavonoid C-glycoside cao nhất, phù hợp với các nghiên cứu trước đây về hoạt tính và vai trò sinh học của nhóm chất này [13]. Kết quả này là cơ sở quan trọng cho việc xác định thời điểm thu hái thích hợp nhằm thu được lượng hợp chất có giá trị cao.

3.4. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết *C. nutans* được đánh giá trên bốn chủng bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch.



Hình 6. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết cây *C. nutans*

Kết quả ở hình 6 cho thấy cao chiết cây 6 tháng tuổi có vòng vô khuẩn lớn hơn so với mẫu cây 2 năm ở cả bốn nồng độ (250 - 1000 mg/ml). Sự khác biệt này phù hợp với hồ sơ chuyển hóa xác định bằng GC-MS (Bảng 1-2) và phân tích heatmap/PCA (Hình 3-5). Mẫu cây 6 tháng tuổi có chứa hàm lượng cao các flavonoid C-glycoside như vitexin, isovitexin và shafoside, những hợp chất đã được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn thông qua cơ chế gây rối loạn màng tế bào và ức chế enzyme nội bào [13]. Ngược lại, mẫu cây 2 năm tuổi giàu acid béo và sterol hơn, là các hợp chất thiên về chức năng

cấu trúc màng và ít đóng góp trực tiếp vào hoạt tính kháng khuẩn.

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thể hiện sự khác biệt theo tuổi sinh trưởng của cây: các nghiên cứu hóa sinh và dược lý cho thấy lá non thường chứa hàm lượng phenolic và flavonoid cao hơn lá già, điều này tương quan với hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* mạnh hơn ở các mẫu và dung môi chiết khác nhau [5]. Kết quả cho thấy cao chiết cây 6 tháng tạo vòng kháng khuẩn lớn hơn, đặc biệt trên các chủng *Pseudomonas aeruginosa* và *Streptococcus pyogenes* [2, 7]. Cây 2 năm tuổi vẫn thể hiện tác dụng kháng khuẩn nhưng xu hướng thấp hơn so với cây 6 tháng, phù hợp với nhận định rằng sự trưởng thành của mô có thể làm giảm tỷ lệ một số hoạt chất sinh học liên quan đến kháng khuẩn.

3.5. Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết *C. nutans* trên thử nghiệm DPPH

Hoạt tính bắt gốc DPPH của cao chiết ở cây 6 tháng, cây 2 năm tuổi và đối chứng ascorbic acid tăng dần theo nồng độ từ 0,5 đến 128 $\mu\text{g/ml}$, đều đạt trên 80% ở nồng độ cao nhất (128 $\mu\text{g/ml}$). Phân tích hồi quy phi tuyến bằng mô hình 4PL cho thấy các đường cong đáp ứng nồng độ phù hợp rất tốt với dữ liệu thực nghiệm, với R^2 dao động từ 0,997 đến 0,999. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Các tham số của mô hình logistic bốn tham số (4PL) và giá trị IC_{50} của các mẫu khảo sát khả năng bắt gốc DPPH

Mẫu	a – Bottom (%)	d – Top (%)	b – Hill	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SE(IC_{50})	R^2
Ascorbic acid	19.12	97.73	1.04	5.77	0.79	0.999
Cây 6 tháng	7.40	94.70	0.92	7.25	0.49	0.999
Cây 2 năm	5.09	92.39	0.90	8.46	2.04	0.997

Ghi chú: Giá trị IC_{50} được ước tính theo mô hình logistic bốn tham số (4PL). SE: sai số chuẩn của ước lượng IC_{50} .

Giá trị IC_{50} thu được như sau: Ascorbic acid: $5,77 \pm 0,79$ $\mu\text{g/mL}$, cây 6 tháng: $7,25 \pm 0,49$ $\mu\text{g/mL}$, cây 2 năm: $8,46 \pm 2,04$ $\mu\text{g/mL}$. Như vậy, ascorbic acid thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất, phù hợp với vai trò chất chuẩn. Đáng chú ý, cao chiết cây 6 tháng có IC_{50} thấp hơn so với cây 2 năm, cho thấy khả năng bắt gốc DPPH mạnh hơn của mẫu ở giai đoạn sinh trưởng sớm.

Sự khác biệt IC_{50} giữa hai nhóm phản ánh xu hướng điều hòa chuyển hóa theo tuổi của *C. nutans*. Kết quả GC-MS ở cây 6 tháng tuổi giàu các flavonoid C-glycoside (vitexin, isovitexin, schaftoside) hơn so với cây 2 năm. Nhóm flavonoid có khả năng cho electron/hydrogen hiệu quả, đóng vai trò then chốt trong cơ chế bắt gốc tự do, nên hàm lượng cao hơn ở cây 6 tháng giải thích cho IC_{50} thấp hơn và hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn ở giai đoạn này.

Theo kết quả của Pannangpetch và cộng sự (2007), IC_{50} DPPH của chiết xuất ethanol từ *C. nutans* dao động từ 28–42 $\mu\text{g/mL}$, cao hơn đáng kể so với kết quả IC_{50} 7,25 – 8,46 $\mu\text{g/mL}$ trong nghiên cứu của chúng tôi [6]. Như vậy, hoạt tính chống oxy hóa của mẫu trong nghiên cứu hiện tại mạnh hơn đáng kể so với nhiều công bố thế giới. Sự khác biệt này có thể từ việc chọn lọc theo độ tuổi sinh trưởng, điều kiện khí hậu, yếu tố thổ nhưỡng tại khu vực nghiên cứu. Kết quả cho thấy độ tuổi thu hái là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt tính sinh học của *C. nutans*, đồng thời mở ra tiềm năng chuẩn hóa nguyên liệu dựa trên giai đoạn sinh trưởng để nâng cao chất lượng dược liệu.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu bước đầu cho thấy độ tuổi của cây *Clinacanthus nutans* có ảnh hưởng đến đặc điểm mô học, thành phần hóa học và hoạt tính sinh học. Cây 6 tháng tuổi có mô mềm chiếm ưu thế, lignin hóa thấp và hàm lượng flavonoid C-glycoside cao hơn đáng kể so với cây 2 năm, điều này được xác nhận qua GC–MS, heatmap và PCA. Về hoạt tính sinh học, mẫu cây 6 tháng tuổi thể hiện khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn vượt trội, với IC_{50} thấp hơn và vòng vô khuẩn cao hơn cây 2 năm tuổi, cho thấy mối liên hệ trực tiếp giữa hàm lượng flavonoid và hiệu quả sinh học.

Tổng hợp các kết quả phân tích mô học, chuyển hóa và hoạt tính sinh học, cho thấy giai đoạn cây 6 tháng tuổi là thời điểm thu hoạch thuận lợi để khai thác nguồn dược liệu giàu flavonoid và có tiềm năng ứng dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Abd Samat, N. M. A., Ahmad, S., Awang, Y., Bakar, R. A. H., & Hakiman, M. (2020). Alterations in Herbage Yield, Antioxidant Activities, Phytochemical Contents, and Bioactive Compounds of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus Nutans* L.) with Regards to Harvesting Age and Harvesting Frequency. *Molecules*, 25(12), 2833.
- [2]. Chiu, H. I., Che Mood, C. N. A., Mohamad Zain, N. N., Ramachandran, M. R., Yahaya, N., Nik Mohamed Kamal, N. N. S., Tung, W. H., Yong, Y. K., Lee, C. K., & Lim, V. (2021). Biogenic Silver Nanoparticles of *Clinacanthus nutans* as Antioxidant with Antimicrobial and Cytotoxic Effects. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2021, 9920890.
- [3]. Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S., & Xia, J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic acids research*, 46(W1), W486–W494. Jasmine Chong 2018
- [4]. Farias, J. P., Barros, A. L. A. N., de Araújo-Nobre, A. R., Sobrinho-Júnior, E. P. C., Alves, M. M. d. M., Carvalho, F. A. d. A., da Franca Rodrigues, K. A., de Andrade, I. M., Silva-Filho, F. A. e., Moreira, D. C., Lima, D. F., Lucarini, M., Durazzo, A., Arcanjo, D. D. R., & de Souza de Almeida Leite, J. R. (2023). Influence of Plant Age on Chemical Composition, Antimicrobial

- Activity and Cytotoxicity of *Varronia curassavica* Jacq. Essential Oil Produced on an Industrial Scale. *Agriculture*, 13(2), 373.
- [5]. Khoo, L. W., Audrey Kow, S., Lee, M. T., Tan, C. P., Shaari, K., Tham, C. L., & Abas, F. (2018). A Comprehensive Review on Phytochemistry and Pharmacological Activities of *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2018, 9276260.
- [6]. Pannangpetch, P., Laupattarakasem, P., Kukongviriyapan, V., Kukongviriyapan, U., Kongyingyoes, B., & Aromdee, C. (2007). Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29(Suppl. 1), 1–9.
- [7]. Pechroj, S., Kaewkod, T., Sattayawat, P., Inta, A., Suriyaprom, S., Yata, T., Tragoolpua, Y., & Promputtha, I. (2024). Multifunctional Nanoemulsified *Clinacanthus nutans* Extract: Synergistic Anti-Pathogenic, Anti-Biofilm, Anti-Inflammatory, and Metabolic Modulation Effects against Periodontitis. *Biology*, 13(10), 815.
- [8]. Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(13), 2452.
- [9]. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- [10]. Tantowi, N. A. C. A., Mohamed, S., Lau, S. F., & Hussin, P. (2020). Comparison of diclofenac with apigenin-glycosides rich *Clinacanthus nutans* extract for amending inflammation and catabolic protease regulations in osteoporotic-osteoarthritis rat model. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 28(2), 443–453.
- [11]. Worley, B., & Powers, R. (2016). PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. *Current Metabolomics*, 4(2), 97–103.
- [12]. Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B., & Wishart, D. S. (2015). MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic acids research*, 43(W1), W251–W257.
- [13]. Yong, Y. K., Tan, J. J., Teh, S. S., Mah, S. H., Ee, G. C. L., Chiong, H. S., & Ahmad, Z. (2013). *Clinacanthus nutans* extracts are antioxidant with antiproliferative effect on cultured human cancer cell lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 462751.

COMPARISON OF SECONDARY METABOLISM CHANGES
OF *Clinacanthus nutans* AT TWO AGE STAGES
AND ITS RELATIONSHIP WITH BIOLOGICAL ACTIVITY

Nguyen Binh Linh Chi¹, Huynh Nhu Y¹,
Nguyen Phan Thuc Quyen¹, Nguyen Vinh Phu², Che Thi Cam Ha^{*1}

¹Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University

²University of Medicine and Pharmacy, Hue University

*Email: chethicamha@husc.edu.vn

ABSTRACT

This study evaluates the histological variation, secondary metabolite profiles, and biological activities of *Clinacanthus nutans* at two growth stages - 6 months and 2 years - to determine the optimal harvest time. Histological observations show that 6-month-old stems consist mainly of parenchyma with low lignification, whereas 2-year-old samples exhibit well-developed secondary xylem and advanced lignification. GC-MS analysis indicates that the 6-month samples are rich in C-glycosyl flavonoids (vitexin, isovitexin, schaftoside), while the 2-year samples predominantly accumulate fatty acids and sterols. Heatmap and PCA analyses reveal clear metabolic separation between the two growth stages. Regarding biological activity, the 6-month sample demonstrates stronger antioxidant capacity ($IC_{50} = 7.25 \mu\text{g/mL}$) than the 2-year sample ($IC_{50} = 8.46 \mu\text{g/mL}$), comparable to that of ascorbic acid. It also exhibits stronger antibacterial activity, particularly against *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes*. Overall, the findings indicate that the 6-month growth stage is the optimal harvest time when targeting Apigenin C-glycoside compounds.

Keywords: *Clinacanthus nutans*; GC-MS; flavonoid C-glycosides; secondary metabolism; antibacterial activity.