

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA VIÊN NANG CỨNG TIÊU HÓA BÀ GIẺNG

Nguyễn Thị Hồng Vinh¹, Nguyễn Thị Hà²
Nguyễn Thái Dương³, Nguyễn Thị Liên^{1*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giẻng trên mô hình động vật thực nghiệm. **Phương pháp nghiên cứu:** Độc tính cấp của viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giẻng được đánh giá trên chuột nhắt trắng Swiss. Độc tính bán trường diễn được đánh giá trên thỏ New Zealand với liều uống 0,747 viên/kg thỏ/ngày (tương đương liều dùng dự kiến trên người) và 2,240 viên/kg thỏ/ngày (tương đương với mức liều cao gấp 3 lần so với liều dự kiến trên người) trong 28 ngày. Đánh giá dựa trên các biểu hiện lâm sàng, chỉ số xét nghiệm huyết học, sinh hóa và mô bệnh học. **Kết quả:** Chưa xác định được LD₅₀ của viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giẻng với liều tối đa có thể cho chuột uống là 82,5 viên/kg (gấp 27,9 lần liều dự kiến trên người). Sau khi uống liên tục trong 28 ngày với mức liều 0,747 viên/kg thỏ/ngày và 2,240 viên/kg thỏ/ngày, thỏ khỏe mạnh, tăng cân, các chỉ số chức năng gan, thận, glucose, huyết học không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nhóm thử với nhóm chứng. Mô bệnh học gan, thận của thỏ không có tổn thương. **Kết luận:** Viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giẻng không gây độc tính cấp và bán trường diễn trên động vật thí nghiệm.

Từ khóa: Độc tính cấp; Độc tính bán trường diễn; Viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giẻng.

STUDY ON THE ACUTE AND SUBCHRONIC TOXICITY OF BA GIANG HARD CAPSULES

Abstract

Objectives: To investigate the acute and subchronic toxicity of Ba Giang hard capsules in experimental animal models. **Methods:** The acute toxicity of Ba Giang

¹Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương

²Nhà máy sản xuất thuốc YHCT Bà Giẻng, Công ty cổ phần Dược phẩm Bagiaco - Chi nhánh Hà Nam

³Công ty TNHH Novopharm

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Liên (nguyenlien.pharm@gmail.com)

Ngày nhận bài: 05/6/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 25/7/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i7.1386>

hard capsules was determined on Swiss mice. The subchronic toxicity of Ba Giang hard capsules has been investigated on New Zealand white rabbits with doses of 0.747 capsules/kg/day (equivalent to the recommended clinical dose) and 2.240 capsules/kg/day (three times higher than the recommended clinical dose) for 28 days. The determination is based on clinical signs, hematological tests, biochemical tests, and histopathology. **Results:** The LD₅₀ of Ba Giang hard capsules has not been determined, with the highest oral dose administered to mice being 82.5 capsules/kg (27.9 times higher than the recommended clinical dose). Rabbits treated orally for 28 days with doses of 0.747 capsule/kg rabbit/day and 2.240 capsule/kg rabbit/day remained healthy, increased weight, and exhibited no significant differences in the hematological and biochemical indexes between the test groups and the control group. Histopathological examination of the liver and kidneys revealed no damage. **Conclusion:** Ba Giang hard capsules showed no acute and subchronic toxic in animals.

Keywords: Acute toxicity; Subchronic toxicity; Ba Giang hard capsule.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hệ tiêu hóa rất quan trọng đối với cơ thể, cần thiết cho việc đồng hóa chất dinh dưỡng cho hệ thống miễn dịch và nội tiết, cũng như cho quá trình chuyển hóa các phân tử nội sinh hoặc ngoại sinh [1]. Theo số liệu thống kê, năm 2019, có 7,32 tỷ ca mắc bệnh tiêu hóa và 2,86 tỷ ca bệnh tiêu hóa lưu hành, gây ra 8 triệu ca tử vong ở 204 quốc gia và vùng lãnh thổ trên thế giới [2]. Các bệnh về tiêu hóa bao gồm nhiều tình trạng bệnh khác nhau ảnh hưởng đến hệ tiêu hóa, là nguồn phổ biến, đáng kể gây ra tình trạng bệnh tật và tử vong ở trên toàn thế giới [2]. 70 - 80% các tế bào miễn dịch của cơ thể có mặt tại ruột nên ruột đóng vai trò quan trọng giúp cơ thể chống lại sự xâm nhập của mầm bệnh vào cơ thể

thông qua đường tiêu hóa [3]. Do đó, hệ tiêu hóa khỏe mạnh góp phần tăng cường khả năng miễn dịch, nâng cao sức đề kháng, giúp cơ thể phòng tránh bệnh tật. Xuất phát từ vai trò của đường tiêu hóa trong sức khỏe con người và thực trạng bệnh lý tiêu hóa ở Việt Nam, Công ty cổ phần Dược phẩm Bagiacco đã phát triển sản phẩm thuốc viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giăng dựa trên công thức gia truyền nhiều thế hệ dùng để điều trị các bệnh hay gặp ở đường tiêu hóa như tiêu chảy cấp, ngộ độc thức ăn, đi ngoài phân lỏng, các triệu chứng ruột kích thích, đi ngoài nhiều lần trong ngày, đau bụng đi ngoài sau khi ăn. Mặc dù hiệu quả của bài thuốc gia truyền đã được chứng minh trên thực tiễn, song nghiên cứu đánh giá độc tính cấp và bán

trường diễn của viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giằng vẫn được tiến hành nhằm: *Cung cấp dữ liệu khoa học về tính an toàn của sản phẩm.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giằng, đạt tiêu chuẩn cơ sở, mỗi viên nang chứa: Sa nhân, Nhục đậu khấu, Nghệ, mộc hương, Bạch truật, Đinh hương, quế, Thương truật, Cam thảo, Tá dược Tinh bột sắn, Magie stearat đủ 1 viên. Liều tối đa dự kiến dùng trên người là 12 viên/người/ngày.

* *Động vật thí nghiệm:* Chuột nhắt trắng Swiss (18 - 22g), thỏ trắng New Zealand trưởng thành (1,8 - 2,2kg), cả hai giống đực và cái. Động vật được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 20 - 30°C, độ ẩm 40 - 80%, chu kỳ ánh sáng 12 giờ sáng, 12 giờ tối, được ăn uống theo nhu cầu với thức ăn công thức phù hợp.

* *Trang thiết bị:* Máy xét nghiệm sinh hóa (Beckman Coulter AU 680, Mỹ), máy xét nghiệm huyết học (Sysmex XS-1000I, Nhật Bản), máy ly tâm lạnh (Eppendorf 5804 R, Đức), máy cắt vi thể Leica (Micro Biosystems, Trung Quốc), kính hiển vi quang học gắn camera kết nối máy tính Leica (Microsystem, Trung Quốc), cân kỹ thuật (Mettler toledo, Thụy Sĩ), chày cối nghiền thuốc (Trung Quốc), dụng cụ

cho chuột và thỏ uống thuốc, dụng cụ phẫu thuật động vật.

* *Hóa chất:* Các bộ kit xác định các chỉ số huyết học và sinh hóa (Stromatolyser và Beckman Coulter), các hóa chất khác.

* *Địa điểm và thời gian nghiên cứu:* Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Dược lý, Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương từ tháng 3 - 4/2024.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Xác định độc tính cấp theo đường uống:*

Thử độc tính cấp được tiến hành theo các hướng dẫn của OECD và hướng dẫn thử độc tính cấp của Đỗ Trung Đàm với phương châm là sử dụng tối thiểu lượng động vật [4, 5].

Chuẩn bị mẫu: Lấy lượng bột thuốc trong 22 viên, nghiền mịn, thêm nước vừa đủ 16mL làm thành hỗn dịch thử. Dựa trên kết quả thử sơ bộ, thử nghiệm chính thức được tiến hành trên 2 nhóm: Nhóm thử uống liều 0,4mL mẫu thử x 3 lần/ngày (liều tối đa có thể cho uống); nhóm chứng uống 0,4mL nước x 3 lần/ngày. Mỗi lần uống cách nhau 2 giờ.

* *Độc tính bán trường diễn theo đường uống:*

Thử nghiệm được tiến hành với 2 mức liều: Liều lâm sàng tương ứng với mức liều dự kiến trên người (nhóm thử 1), liều gấp 3 lần liều lâm sàng (nhóm thử 2). Nhóm chứng uống nước.

Mỗi nhóm 07 con uống liên tục trong 28 ngày, mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng [6, 7].

Chuẩn bị mẫu thử: Xay mịn 56 viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giăng, thêm nước vừa đủ để thu được 125mL hỗn dịch thuốc (dùng cho nhóm thử 2). Pha loãng 30mL hỗn dịch trên với nước vừa đủ 90mL (dùng cho nhóm thử 1). Thể tích cho uống 5 mL/kg.

Các chỉ tiêu đánh giá: Cân nặng của thỏ tại các thời điểm 0, 7, 14, 21, 28 ngày uống mẫu thử, quan sát hoạt động, ăn uống, lông, tiêu hóa, thần kinh, chỉ số huyết học, sinh hóa, glucose tại các thời điểm 0, 14, 28 ngày uống mẫu thử. Sau 28 ngày uống thuốc, mổ quan sát đại thể tim, gan, lách, thận, phổi, dạ dày,

ruột và làm tiêu bản giải phẫu mô bệnh học gan, thận (mỗi nhóm 03 thỏ).

** Xử lý và phân tích số liệu:*

Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình (Mean) $\pm$ độ lệch chuẩn (SD) và được phân tích thống kê bằng trắc nghiệm Student. Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện theo đúng theo các quy định của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Số liệu nghiên cứu được Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Công ty cổ phần Dược phẩm Bagiacco cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp

Bảng 1. Bảng so sánh cân nặng chuột.

Nhóm (n = 10)	Trước thử nghiệm		Sau thử nghiệm (ngày 7)		$P_{\text{trước-sau}}$
	Khối lượng (g)	$p_{\text{trước}}$	Khối lượng (g)	p_{sau}	
Chứng	$19,58 \pm 0,89$	$> 0,05$	$31,51 \pm 1,70$	$> 0,05$	$< 0,001$
Thử	$20,26 \pm 1,21$		$32,17 \pm 2,21$		$< 0,001$

Trong thời gian theo dõi 24 giờ sau khi uống mẫu thử, chuột không có biểu hiện bất thường, không có chuột chết. Theo dõi các ngày tiếp theo đến 7 ngày sau khi uống thuốc: Không có chuột chết, chuột ăn uống, hoạt động bình thường, phân khô, lông mượt, da và niêm mạc hồng. Kết quả theo dõi trọng lượng chuột trước và sau thử nghiệm không có sự khác biệt giữa nhóm thử và nhóm chứng ($p > 0,5$), chuột ở cả nhóm thử và chứng đều tăng cân tốt so với trước thử nghiệm ($p < 0,001$).

2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn

* Tình trạng thỏ:

Bảng 2. Kết quả theo dõi cân nặng của thỏ.

Nhóm (n = 7)	Cân nặng thỏ (kg)					P ^{trước-sau}
	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21	Ngày 28	
Chứng (1)	1,93 ± 0,09	2,02 ± 0,09	2,19 ± 0,09	2,25 ± 0,12	2,41 ± 0,16	< 0,001
Thử 1 (2)	1,99 ± 0,15	2,09 ± 0,14	2,22 ± 0,17	2,28 ± 0,16	2,38 ± 0,22	< 0,001
Thử 2 (3)	1,95 ± 0,13	2,08 ± 0,14	2,14 ± 0,18	2,24 ± 0,12	2,37 ± 0,10	< 0,001
p _{1,2,3}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Kết quả theo dõi cân nặng thỏ cho thấy: Trước thí nghiệm, cân nặng trung bình của thỏ ở các nhóm thử không có sự khác biệt so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Sau 28 ngày uống mẫu thử, thỏ ở nhóm chứng và hai nhóm thử đều tăng cân có ý nghĩa thống kê so với trước thử nghiệm ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về cân nặng trung bình giữa nhóm thử và nhóm chứng ($p > 0,05$).

* Chỉ số huyết học liên quan tới chức năng tạo máu:

Bảng 3. Các chỉ số huyết học.

Chỉ số	Thời điểm	Nhóm thử nghiệm (n = 7)			P _{1,2,3}
		Chứng (1)	Thử 1 (2)	Thử 2 (3)	
Hồng cầu ($\times 10^{12}/L$)	Ngày 0 (a)	5,7 ± 0,5	5,4 ± 0,7	5,8 ± 0,7	> 0,05
	Ngày 14 (b)	5,4 ± 0,5	5,5 ± 0,3	5,7 ± 0,6	> 0,05
	Ngày 28 (c)	5,4 ± 0,5	5,7 ± 0,5	5,6 ± 0,7	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Bạch cầu ($\times 10^9/L$)	Ngày 0 (a)	7,0 ± 1,9	6,9 ± 3,0	6,8 ± 2,0	> 0,05
	Ngày 14 (b)	8,4 ± 1,6	8,2 ± 2,3	7,3 ± 1,7	> 0,05
	Ngày 28 (c)	8,5 ± 1,6	8,6 ± 1,9	7,8 ± 0,9	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Chỉ số	Thời điểm	Nhóm thử nghiệm (n = 7)			p _{1,2,3}
		Chứng (1)	Thử 1 (2)	Thử 2 (3)	
Tiểu cầu (× 10 ⁹ /L)	Ngày 0 (a)	500,4 ± 124,3	515,4 ± 127,2	560,7 ± 106,0	> 0,05
	Ngày 14 (b)	491,6 ± 96,2	459,3 ± 114,0	519,9 ± 127,8	> 0,05
	Ngày 28 (c)	471,7 ± 127,0	539,7 ± 119,1	502,4 ± 110,0	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Hematocrit (%)	Ngày 0 (a)	37,6 ± 2,5	36,0 ± 4,4	38,4 ± 3,0	> 0,05
	Ngày 14 (b)	36,1 ± 3,2	37,8 ± 1,8	38,4 ± 3,0	> 0,05
	Ngày 28 (c)	35,8 ± 3,1	38,0 ± 1,6	36,8 ± 3,6	> 0,05
	Ngày 0 (a)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Hemoglobin (g/dL)	Ngày 0 (a)	12,0 ± 0,8	11,3 ± 1,3	12,6 ± 0,8	> 0,05
	Ngày 14 (b)	11,4 ± 1,0	11,7 ± 0,6	12,0 ± 0,9	> 0,05
	Ngày 28 (c)	11,6 ± 1,2	12,5 ± 0,8	11,9 ± 1,3	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Kết quả xét nghiệm một số chỉ số huyết học cho thấy: Trước khi uống mẫu thử, không có sự khác biệt có ý nghĩa về chỉ số huyết học giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử (p > 0,05). Sau 14 và 28 ngày uống mẫu thử, không có sự khác biệt có ý nghĩa về chỉ số huyết học giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử (p > 0,05).

* *Chỉ số sinh hóa:*

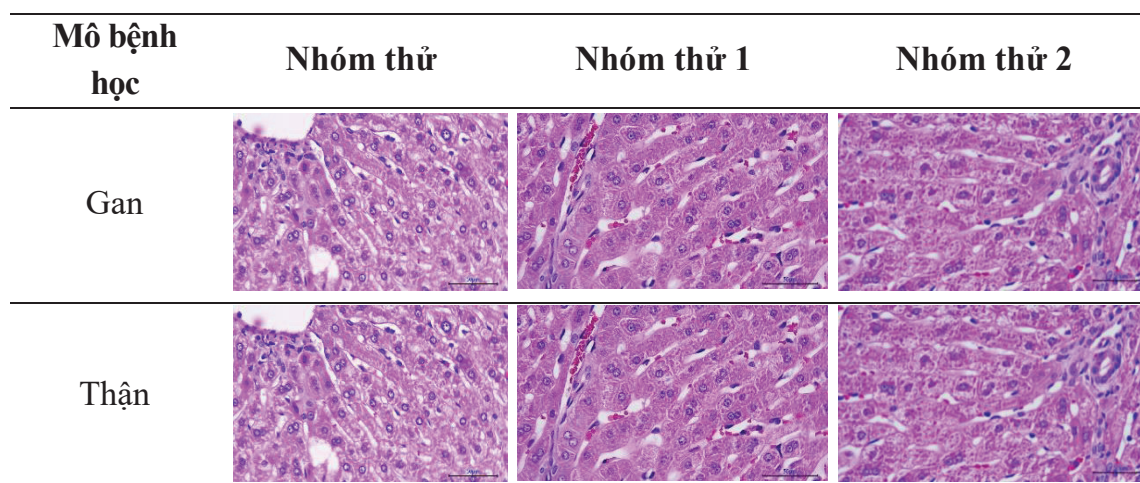
Bảng 4. Các chỉ số sinh hóa.

Chỉ số	Thời điểm	Nhóm thử nghiệm (n = 7)			p _{1,2,3}
		Chứng (1)	Thử 1 (2)	Thử 2 (3)	
AST (U/L)	Ngày 0 (a)	21,4 ± 7,4	28,7 ± 8,1	20,5 ± 3,4	> 0,05
	Ngày 14 (b)	29,6 ± 5,7	33,8 ± 9,1	30,3 ± 9,4	> 0,05
	Ngày 28 (c)	21,9 ± 7,0	25,6 ± 5,8	25,4 ± 8,0	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
ALT (U/L)	Ngày 0 (a)	44,1 ± 13,2	44,9 ± 16,0	42,0 ± 13,2	> 0,05
	Ngày 14 (b)	47,0 ± 14,9	51,2 ± 12,4	46,1 ± 16,7	> 0,05
	Ngày 28 (c)	45,1 ± 15,8	49,0 ± 13,9	42,2 ± 11,7	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Chỉ số	Thời điểm	Nhóm thử nghiệm (n = 7)			P _{1,2,3}
		Chứng (1)	Thử 1 (2)	Thử 2 (3)	
Bilirubin toàn phần (mmol/L)	Ngày 0 (a)	2,0 ± 0,6	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,7	> 0,05
	Ngày 14 (b)	2,4 ± 0,3	2,5 ± 0,2	2,7 ± 0,6	> 0,05
	Ngày 28 (c)	2,3 ± 0,5	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,3	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Albumin (g/L)	Ngày 0 (a)	38,5 ± 1,4	37,2 ± 1,8	37,0 ± 1,9	> 0,05
	Ngày 14 (b)	37,9 ± 3,6	38,1 ± 2,1	37,4 ± 1,5	> 0,05
	Ngày 28 (c)	38,0 ± 3,6	38,5 ± 1,9	37,2 ± 1,2	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Cholesterol (mmol/L)	Ngày 0 (a)	1,9 ± 0,6	2,1 ± 0,6	2,0 ± 0,7	> 0,05
	Ngày 14 (b)	1,8 ± 0,5	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,6	> 0,05
	Ngày 28 (c)	1,9 ± 0,5	2,0 ± 0,6	2,1 ± 0,5	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Urê (mmol/L)	Ngày 0 (a)	4,4 ± 1,0	3,6 ± 0,6	4,2 ± 1,6	> 0,05
	Ngày 14 (b)	4,2 ± 0,9	3,7 ± 0,5	4,3 ± 1,0	> 0,05
	Ngày 28 (c)	4,7 ± 1,0	4,0 ± 0,6	4,2 ± 0,6	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Creatinine (μmol/L)	Ngày 0 (a)	76,6 ± 13,4	72,0 ± 10,7	71,6 ± 8,1	> 0,05
	Ngày 14 (b)	78,7 ± 8,9	73,1 ± 13,8	71,4 ± 14,1	> 0,05
	Ngày 28 (c)	82,8 ± 12,3	76,8 ± 7,6	73,8 ± 6,4	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Glucose (mmol/L)	Ngày 0 (a)	6,4 ± 0,7	6,3 ± 0,7	6,1 ± 0,7	> 0,05
	Ngày 14 (b)	5,7 ± 0,7	5,6 ± 1,0	5,6 ± 0,7	> 0,05
	Ngày 28 (c)	5,7 ± 0,7	5,8 ± 0,9	5,4 ± 0,8	> 0,05
	p _{a,b,c}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Kết quả xét nghiệm một số chỉ số sinh hóa cho thấy: Trước khi uống mẫu thử, không có sự khác biệt có ý nghĩa về các chỉ số sinh hóa giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử ($p > 0,05$). Sau 14 và sau 28 ngày uống mẫu thử, không có sự khác biệt có ý nghĩa về các chỉ số sinh hóa giữa nhóm chứng và 2 nhóm thử ($p > 0,05$).

* Mô bệnh học:



Hình 1. Hình ảnh đại diện mô bệnh học gan và thận của thỏ.

Quan sát đại thể các cơ quan nội tạng của tất cả các thỏ thử nghiệm cho thấy không có biểu hiện khác thường về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, gan, thận, phổi, dạ dày, ruột của các thỏ nhóm thử so với nhóm chứng sau thử nghiệm.

Quan sát vi thể tiêu bản gan và thận của thỏ nhận thấy thỏ thí nghiệm đều có gan, thận không bị tổn thương, hình ảnh cấu trúc trong giới hạn bình thường.

KẾT LUẬN

Mẫu thử viên nang cứng Tiêu hóa Bà Giảng không gây độc tính cấp trên chuột nhắt trắng ở liều tối đa có thể cho uống là 82,5 viên/kg (gấp 27,9 lần liều dự kiến dùng trên người) và không gây độc tính bán trường diễn trên thỏ sau khi uống liên tục 28 ngày với liều 0,747 viên/kg/ngày (tương đương với mức liều dự kiến trên người) và liều 2,240 viên/kg/ngày (tương đương với mức liều cao gấp 3 lần so với liều dự kiến trên người).

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp tại Khoa Dược lý, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã tham gia thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Filali S, Pirot F, Miossec P. Biological applications and toxicity minimization of semiconductor quantum dots. *Trends Biotechnol.* 2020; 38(2): 163-177.

2. Wang Y, Huang Y, Chase RC, et al. Global burden of digestive diseases: A Systematic analysis of the global burden of diseases study, 1990 to 2019. *Gastroenterology*. 2023; 165(3):773-783.
3. Wiertsema SP, van Bergenhenegouwen J, Garssen J, Knippels LMJ. The interplay between the gut microbiome and the immune system in the context of infectious diseases throughout life and the role of nutrition in optimizing treatment strategies. *Nutrients*. 2021; 13(3):886.
4. Đỗ Trung Đàm. Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp của thuốc. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội. 2014: 13-182.
5. OECD. Test No.423: Acute oral toxicity - Acute toxic class method. OECD guidelines for the testing of chemicals. 2002.
6. Bộ Y tế. Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu. QĐ 141-QĐ-K2ĐT 27/10/2015.
7. OECD. Test No.407: Repeated dose 28 - days Oral Toxicity study in Rodents, OECD guidelines for the testing of chemicals. 2008.