

PENGUBAHSUAIAN KAEDAH ANALISIS BAGI PIRONARIDINA DI
DALAM PLASMA DAN PERBANDINGAN FORMULASI PIRONARIDINA
DALAM KAJIAN FARMAKOKINETIK

OLEH

SARALA DEVI A/P G. JAYARAMAN

Tesis yang diserahkan untuk memenuhi
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains

Mei 1999

PENERBITAN

Jayaraman, S.D., Ismail, S., Nair, N.K. & Navaratnam, V. (1997). Determination of pyronaridine in blood plasma by high-performance liquid chromatography for application in clinical pharmacological studies. J. Chromatogr Biomed. Applic. **690**, 253-257.

Jayaraman, S.D., Ismail, S., Looreesuwan, S., Nair, N.K. & Navaratnam, V. A single cross-over pharmacokinetic study of two oral formulations of pyronaridine in healthy Thai volunteers. 5 th Western Pacific Congress of Chemotherapy & Infectious Diseases. (1-4 Dec 1996). Singapore. (an abstract). 206.

dedicated to my,

husband

.....for his love and concern

parents

.....for their guidance

brother

.....for his support

friends

.....for their help.

PENGHARGAAN

Saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Institut Pengajian Siswazah, USM di atas bantuan siswazah pembantu. Saya juga ingin merakamkan setinggi-tinggi terima kasih kepada Prof. Dr. V. Navaratnam, Pengarah Pusat Penyelidikan Dadah dan Ubat-ubatan di atas kemudahan makmal dan sokongan. Saya juga ingin mengambil kesempatan di sini untuk menyampaikan ribuan terima kasih dan penghargaan kepada penyelia utama, Prof. N.K. Nair dan juga penyelia kedua, Dr. Sabariah Ismail di atas sokongan, bimbingan dan nasihat mereka sepanjang masa penyelidikan ini dijalankan. Penghargaan juga ingin disampaikan kepada Prof. S. Looareesuwan and Prof. W.H. Werndorfer di atas sokongan dan nasihat. Saya ingin mengucapkan terima kasih kepada Prof. Madya Dr. Shariff Mahsufi Mansor, Dr. Nornisah Mohamed dan Dr. Roziahanim Mahmud di atas bantuan mereka. Ucapan terima kasih juga saya tujukan kepada En. Arunachalam, En. Teoh Teik Ho dan pembantu-pembantu makmal lain dan rakan-rakan saya dari Pusat Penyelidikan Dadah dan Ubatan-ubatan di atas bantuan teknikal dan dorongan mereka.

JADUAL KANDUNGAN

	muka surat
PENERBITAN	ii
DEDIKASI	iii
PENGHARGAAN	iv
JADUAL KANDUNGAN	v
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	xi
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xv
BAB 1 : PENGENALAN	1
1.1 Malaria	1
1.2 Status malaria di Malaysia	1
1.3 Patologi dan kemoterapi malaria	2
1.3.1 Kitar hidup malaria	2
1.3.2 Wujud semula dan rekrudesens	5
1.3.3 Pengkelasan drug antimalaria	6
1.3.4 Vaksin malaria	7
1.4 Rintangan drug	8
1.5 Farmakologi Pironaridina	10
1.5.1 Sintesis pironaridina	10
1.5.2 Sifat kimia pironaridina	14
1.5.3 Perkembangan pra-klinikal	14
1.5.3.1 Kemujaraban ke atas parasit malaria di dalam model haiwan	14
1.5.3.2 Toksikologi	17

1.5.4	Aspek klinikal	19
1.5.4.1	Tolerans	19
1.5.4.2	Kemujaraban	20
1.5.4.3	Regimen dos terapeutik	23
1.5.5	Kaedah analisis	23
1.5.6	Farmakokinetik	27
1.5.6.1	Penyerapan	27
1.5.6.2	Penyebaran	27
1.5.7	Tapak tindakan	27
1.6	Parameter farmakokinetik	28
1.7	Tujuan kajian	29
BAB 2	BAHAN DAN KAEDAH	31
2.1	Bahan-bahan kimia	31
2.2	Bahan-bahan piawai	31
2.3	Penyediaan larutan piawai	31
2.4	Pensilanaan	32
2.5	Sifat-sifat fizikokimia	32
2.5.1	Pendarflour	32
2.5.2	Ultralembayung	32
2.5.3	Inframerah	33
2.6	Kestabilan pironaridina	33
2.6.1	Kestabilan larutan piawai pironaridina	33
2.6.2	Kestabilan pironaridina terhadap cahaya	33
2.6.3	Kestabilan pironaridina di dalam plasma	34
2.7	Kaedah analisis	34
2.7.1	Pengubahsuaian kaedah kromatografi cecair keupayaan tinggi	34
2.7.1.1	Pengesan	34
2.7.1.2	Turus	35
2.7.1.3	Fasa gerak	35
2.7.2	Pemilihan piawai dalaman	35
2.7.3	Pengubahsuaian kaedah pengekstrakan pelarut	35
2.7.3.1	Perubahan pH larutan penimbal pengekstrakan	36
2.7.3.2	Perubahan isipadu pelarut pengekstrakan	36
2.7.3.3	Kaedah pengekstrakan yang diperkembangkan	36
2.7.4	Kelinearan pengesan	37
2.7.5	Penyediaan keluk tentukan piawai	37
2.7.6	Peratus pemulihan	37

2.7.7	Kebersihan intra esei dan inter esei	37
2.7.8	Had pengesanan kaedah	38
BAB 3 : KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN		39
3.1	Sifat-sifat fizikokimia	39
3.1.1	Spektrum pendarflour	39
3.1.2	Spetrum ultralembayung	40
3.1.3	Spektrum inframerah	40
3.2	Kestabilan pironaridina	47
3.2.1	Kestabilan larutan piawai pironaridina	47
3.2.2	Kestabilan pironaridina terhadap cahaya	47
3.2.3	Kestabilan pironaridina di dalam plasma	48
3.3	Pemilihan kaedah analisis	53
3.3.1	Pengubahsuaian kaedah kromatografi cecair keupayaan tinggi	54
3.3.2	Pemilihan piawai dalaman	54
3.3.3	Pengubahsuaian kaedah pengekstrakan pelarut	57
3.3.3.1	Kesan pH larutan penimbal pengekstrakan	57
3.3.3.2	Kesan isipadu pelarut pengekstrakan	57
3.3.4	Kelinearan dan had pengesanan pengesanan pendarflour	59
3.3.5	Keluk tentukuran piawai	59
3.3.6	Peratus pemulihan	63
3.3.7	Kebersihan intra esei dan inter esei	63
3.3.8	Had pengesanan kaedah	66
3.3.9	Penggunaan kaedah di dalam kajian awal farmakokinetik	66
BAB 4 : KAJIAN FARMAKOKINETIK “CROSS-OVER” TUNGGAL DENGAN DUA FORMULASI ORAL DARIPADA DOS TUNGGAL PIRONARIDINA DI DALAM SUBJEK THAI		69
4.1	Protokol klinikal	69
4.1.1	Objektif kajian	69
4.1.2	Ujian drug dan formulasi	69
4.1.3	Kriteria pemilihan subjek	69
4.1.4	Kriteria penyingkiran	70
4.1.5	Penamatan kajian	70
4.1.6	Kaedah pemberian drug dan pengumpulan sampel	70
4.1.7	Pembatasan makanan	70
4.1.8	Keselamatan	71
4.2	Penganalisaan sampel plasma	71
4.3	Analisis data farmakokinetik	71

4.4 Analisis statistikal	71
4.5 Keputusan	71
4.6 Perbincangan	87
BAB 5 : KESIMPULAN	90
5.1 Rancangan masa hadapan	91
BIBLIOGRAFI	92

SENARAI JADUAL

Jadual		muka surat
1.1	Ringkasan beberapa kaedah analisis bagi analisis pironaridina di dalam bendalir biologi	26
3.1	Nilai penyerapan pironaridina pada pH yang berlainan	41
3.2	Nombor gelombang beberapa kawasan jalur spektrum IR bagi pironaridina	46
3.3	Profil kestabilan pironaridina di dalam keadaan simpanan yang berlainan selama 90 hari (n=4)	50
3.4	Profil kestabilan pironaridina terhadap cahaya pada suhu bilik selama 60 hari (n=4)	51
3.5	Profil kestabilan pironaridina di dalam plasma pada keadaan simpanan yang berlainan selama 90 hari (n=4)	52
3.6	Kesan pH pengekstrakan terhadap peratus pemulihan	58
3.7	Kesan isipadu pengekstrakan terhadap peratus pemulihan	60
3.8	Pemulihan pironaridina daripada plasma (n=5)	64
3.9	Kepersisan intra esei bagi cerakin pironaridina di dalam plasma (n=4)	64
3.10	Kepersisan inter esei (tiap hari selama 5 hari) bagi cerakin pironaridina di dalam plasma (n=5)	65
4.1	Data dalam bentuk demografik bagi subjek yang mengambil bahagian dalam kajian	75
4.2	Keputusan ujian makmal bagi subjek (n=6) selepas menerima dos pironaridina (formulasi larutan; 6mg/kg)	76
4.3	Keputusan ujian makmal bagi subjek (n=6) selepas menerima dos pironaridina (formulasi kapsul; 6mg/kg)	77

4.4	Kepekatan plasma pironaridina (ng/ml) di dalam sukarelawan sihat Thai yang mengikuti pemberian dos oral tunggal pironaridina (formulasi larutan; 6 mg/kg)	78
4.5	Kepekatan plasma pironaridina (ng/ml) di dalam sukarelawan sihat Thai yang mengikuti pemberian dos oral tunggal pironaridina (formulasi kapsul; 6 mg/kg)	79
4.6	Kepekatan plasma pironaridina (purata \pm s.d.) di dalam sukarelawan sihat Thai (n=6) yang menerima dos oral tunggal pironaridina melalui formulasi larutan dan kapsul sebanyak 6 mg/kg pironaridina	80
4.7	Parameter-parameter farmakokinetik pironaridina di dalam sukarelawan sihat Thai yang menerima dos oral tunggal pironaridina (formulasi larutan; 6 mg/kg)	81
4.8	Parameter-parameter farmakokinetik pironaridina di dalam sukarelawan sihat Thai yang menerima dos oral tunggal pironaridina (formulasi kapsul; 6 mg/kg)	82
4.9	Parameter-parameter farmakokinetik pironaridina (purata \pm s.d.) di dalam sukarelawan sihat Thai yang menerima dos oral tunggal pironaridina (formulasi larutan dan kapsul; 6 mg/kg)	83

SENARAI RAJAH

Rajah		muka surat
1.1	Kitaran hidup parasit malaria dan tapak-tapak tindakan drug-drug antimalaria	4
1.2	Struktur drug antimalaria	12
1.3	Langkah-langkah utama sintesis pironaridina	13
3.1	Spektrum pengujaan bagi pironaridina di dalam larutan penimbal fosfat pH 6	42
3.2	Spektrum pemancaran bagi pironaridina di dalam larutan penimbal fosfat pH 6	43
3.3	Spektrum ultralembayung bagi pironaridina di dalam larutan piawai penimbal fosfat pH 7	44
3.4	Spektrum inframerah bagi pironaridina	45
3.5	Kromatogram-kromatogram tipikal bagi analisis pironaridina: (A) Sampel pironaridina piawai (1) (kepekatan pada turus, 250 ng) dan kuinina (2) (kepekatan pada turus, 500 ng); (B) Sampel plasma bebas-drug; (C) Sampel plasma yang dipakukan dengan pironaridina (1) (kepekatan pada turus, 100 ng) dan kuinina (2) (kepekatan pada turus, 500 ng)	56
3.6	Respon pengesan pendarflour terhadap pironaridina pada julat 1-1000 ng	61
3.7	Keluk penentukuran piawai bagi pironaridina dalam julat kepekatan 5-80 ng/250 μ l plasma. Paksi-y ialah nisbah tinggi puncak pironaridina terhadap piawai dalaman dan paksi-x ialah kepekatan pironaridina dalam unit ng/250 μ l plasma	62
3.8	Kepekatan plasma pironaridina dalam sukarelawan sihat yang menerima pemberian dos oral tunggal sebanyak 6 mg/kg pironaridina (formulasi kapsul)	68

- 4.1 Kepekatan plasma pironaridina (purata \pm s.e.m.) di dalam sukarelawan sihat Thai (n=6) yang menerima pemberian dos oral tunggal sebanyak 6 mg/kg pironaridina (formulasi larutan) 84
- 4.2 Kepekatan plasma pironaridina (purata \pm s.e.m.) di dalam sukarelawan sihat Thai (n=6) yang menerima pemberian dos oral tunggal sebanyak 6 mg/kg pironaridina (formulasi kapsul) 85
- 4.3 Kepekatan plasma pironaridina (purata \pm s.e.m.) di dalam sukarelawan sihat Thai (n=6) yang menerima pemberian dos oral tunggal sebanyak 6 mg/kg pironaridina (gabungan formulasi larutan \blacklozenge dan kapsul \square) 86

ABSTRAK

Pironaridina merupakan drug antimalaria yang berpotensi tinggi dalam rawatan malaria dan baru-baru ini ia menghasilkan keputusan yang menggalakkan di dalam cubaan klinikal yang dijalankan di Cameroon dan Thailand. Kaedah yang diterangkan bagi penentuan pironaridina di dalam plasma menggunakan kromatografi cecair kepayaan tinggi dengan pengesan pendarflour. Kaedah tersebut melibatkan pengestrakan pelarut dengan menggunakan larutan penimbal fosfat (pH 6, 0.05M) dan dietil eter:heksana (70:30 %, v/v) dan pemisahan kromatografik dilakukan ke atas turus C₁₈ (Nucleosil, 250 x 4.6 mm d.d., 5 µm saiz partikal). Fasa gerak terdiri daripada asetonitril dan 0.05M larutan penimbal fosfat pH 6 (60:40%, v/v) dengan kadar aliran pada 1.0 ml/min dan pengesanan melalui pendarflour ($\lambda_{ex} = 267 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 443 \text{ nm}$). Respon pengesan adalah linear sehingga 1000 ng dan peratus pemulihan keseluruhan pironaridina dan kuinina ialah 90.0 dan 60.3% masing-masing. Kaedah analisis ini adalah peka untuk mengukur 10 ng/ml pironaridina di dalam sampel plasma dengan kepersisan yang boleh diterima (< 15% CV). Kaedah tersebut adalah sesuai untuk kegunaan dalam kajian farmakologi klinikal.

Pironaridina kini dapat diperolehi dalam bentuk tablet yang bersalut tetapi ia mempunyai ketersediaan biologi yang rendah (20%). Ketersediaan biologi drug tersebut di dalam kapsul didapati lebih baik (30%). Maka kajian ini membandingkan ketersediaan biologi relatif formulasi kapsul pironaridina dan formulasi larutan pironaridina di dalam sukarelawan sihat Thai.

Dos tunggal pironaridina (6 mg/kg) diberikan kepada subjek (n=6) samada dalam bentuk formulasi kapsul atau larutan. Selepas waktu pembersihan selama 19 hari, setiap subjek akan diberikan satu lagi dos pironaridina dalam bentuk formulasi yang lagi satu. Sampel plasma diambil pada masa-masa tertentu dan disimpan pada suhu -70°C sehingga analisis oleh kromatografi cecair keupayaan tinggi. Parameter-parameter farmakokinetik ditentukan daripada analisis keluk kepekatan masa pironaridina. Didapati tiada perbezaan bermakna wujud di dalam semua parameter ($p>0.05$). Di dalam kajian ini, larutan pironaridina gagal menunjukkan kelebihan berbanding dengan formulasi kapsul yang lebih mudah digunakan secara praktikal. Ketersediaan biologi relatif pironaridina selepas pemberian oral secara kapsul relatif kepada pemberian oral secara formulasi larutan adalah 111.7%. Nilai ini menunjukkan hanya sedikit perbezaan ketersediaan biologi wujud di antara dua formulasi ini.

MODIFICATION OF ANALYTICAL METHOD FOR PYRONARIDINE IN PLASMA AND COMPARISON OF PYRONARIDINE FORMULATION IN PHARMACOKINETIC STUDIES

ABSTRACT

Pyronaridine is a promising drug for the treatment of uncomplicated malaria and has been recently received encouraging results in clinical trials conducted in Cameroon and Thailand. A method is described for the determination of pyronaridine in plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. The method involved liquid-liquid extraction using phosphate buffer (pH 6, 0.05M) and diethyl ether:hexane (70:30 %, v/v) chromatographic separation on a C₁₈ column (Nucleosil, 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) with acetonitrile and 0.05M phosphate buffer of pH 6 (60:40%, v/v) as the mobile phase with flow rate at 1.0 ml/min and detection by fluorescence ($\lambda_{ex} = 267$ nm, $\lambda_{em} = 443$ nm). The detector's response is linear up to 1000 ng and the overall recoveries of pyronaridine and quinine were 90.0 and 60.3% respectively. The assay procedure was adequately sensitive to measure 10 ng/ml pyronaridine in plasma samples with acceptable precision (< 15% CV). The method was found to be suitable for use in clinical pharmacological studies.

Pyronaridine is currently available as enteric coated (EC) tablets but the bioavailability is poor (20%). The bioavailability of the drug in capsules appear to be better (30%). This investigation compares the relative bioavailabilities of pyronaridine capsule and solution formulations in healthy Thai volunteers.

A single dose of pyronaridine (6 mg/kg) was given to subjects (n=6) either by capsule or solution formulations. After a washout period of 19 days, each subject was given another dose of pyronaridine using the other formulation. Blood plasma samples were drawn at appropriate time points and samples were stored at -70°C until analysis by HPLC. Pharmacokinetic parameters were determined from analysis of concentration time curves of pyronaridine. There were no significant differences in all the parameters ($p>0.05$). In this study pyronaridine solution failed to show a distinct advantage over the capsule formulation which is easier to use in practice. Relative bioavailability after administration by capsule formulation relative to the administration by solution formulation is 111.7%. This value shows that there is little difference in the bioavailability of the two formulations.

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Malaria

Malaria masih merupakan salah satu penyakit parasit yang utama di kawasan tropika dan subtropika. Ini adalah kerana jumlah penduduk yang terdedah kepada penyakit ini adalah yang terbesar iaitu 2400 juta berbanding dengan penyakit-penyakit tropika utama yang lain yang merebak melalui vektor. Didapati di antara 1 hingga 3 juta kanak-kanak di Afrika mati akibat penyakit malaria (Dayton, 1994). Khususnya, kanak-kanak di bawah umur lima tahun menjadi mangsa malaria dan kes kematian malaria menjadi tinggi sehingga mereka memerlukan separa imunasi (Wolde, 1994).

Memandangkan ia satu masalah kesihatan yang serius, perhatian yang berat telah diberikan oleh agensi-agensi penyelidikan seperti World Health Organization (WHO) untuk mengatasi masalah tersebut. Program pengawalan malaria masih merupakan satu masalah rumit di negara-negara yang sedang membangun. Maka drug antimalaria digunakan untuk mencegah permulaan penyakit, merawat kes klinikal serta mencegah transmisi penyakit. Walaubagaimanapun, kajian menunjukkan bahawa ketersediaan drug antimalaria yang tidak sekata menjadi punca kewujudan rintangan parasit yang awal terhadap drug, tambahan lagi, rintangan cepat berlaku (Draper et al., 1988; Landgraf et al., 1994). Rintangan awal seperti ini telah dilaporkan di seluruh dunia (Bjorkman & Phillips-Howard, 1990; Wernsdorfer, 1991, 1994). Maka perkembangan ubat antimalaria dengan mekanisme tindakan yang baru yang boleh menghalang atau melambatkan pembentukan sifat rintangan terhadap antimalaria amat diperlukan (White, 1992).

1.2 Status malaria di Malaysia

Malaysia merupakan negara tropika yang terdedah kepada ancaman penyakit malaria. Sebelum tahun 1967, adalah dianggarkan terdapat anggaran 300,000 kes-kes

malaria setiap tahun di Semenanjung Malaysia sahaja dan program penghapusan dilancarkan secara rasminya. Akan tetapi penghapusan tidak dapat dicapai sepenuhnya. Maka dalam tahun 1981, konsep penghapusan telah ditukarkan kepada bentuk program pengawalan yang dilaksanakan di bawah Program Kawalan Penyakit Bawaan Vektor (RKPBV).

Di dalam tahun 1983 dan 1984, bilangan kes malaria di Malaysia adalah 19,019 dan 30,424. Kes kematian malaria yang dilaporkan pula ialah 11 dan 17 kes masing-masing. Di Sabah sahaja terdapat 11,290 dan 21,358 kes dalam tahun 1983 dan 1984. Ini adalah disebabkan oleh 48% daripada jumlah penduduk Sabah tinggal di kawasan jangkitan malaria yang tinggi (Kementerian Kesihatan Malaysia, 1983/84).

Mengikut statistik tahun 1993 yang diperolehi daripada Program Kawalan Penyakit Bawaan Vektor menunjukkan bahawa kes malaria di Malaysia ialah 39,890 dan kes kematian malaria ialah 23. Kebanyakannya dilaporkan di Sabah iaitu sebanyak 29,130 merupakan kes malaria dan 13 kes kematian malaria. Sebanyak 82.44% daripada jumlah kes yang dikesan adalah dari kawasan jangkitan malaria yang tinggi. Kebanyakan kes malaria yang dikesan adalah disebabkan oleh *P. falciparum* (65.03%) dan diikuti dengan *P. vivax* (31.7%). Walaupun dianggarkan 80.46% daripada jumlah penduduk Malaysia tinggal di kawasan tanpa malaria, kes kejadian malaria masih tidak berkurangan dalam tempoh sepuluh tahun ini (Ministry of Health Malaysia, 1993).

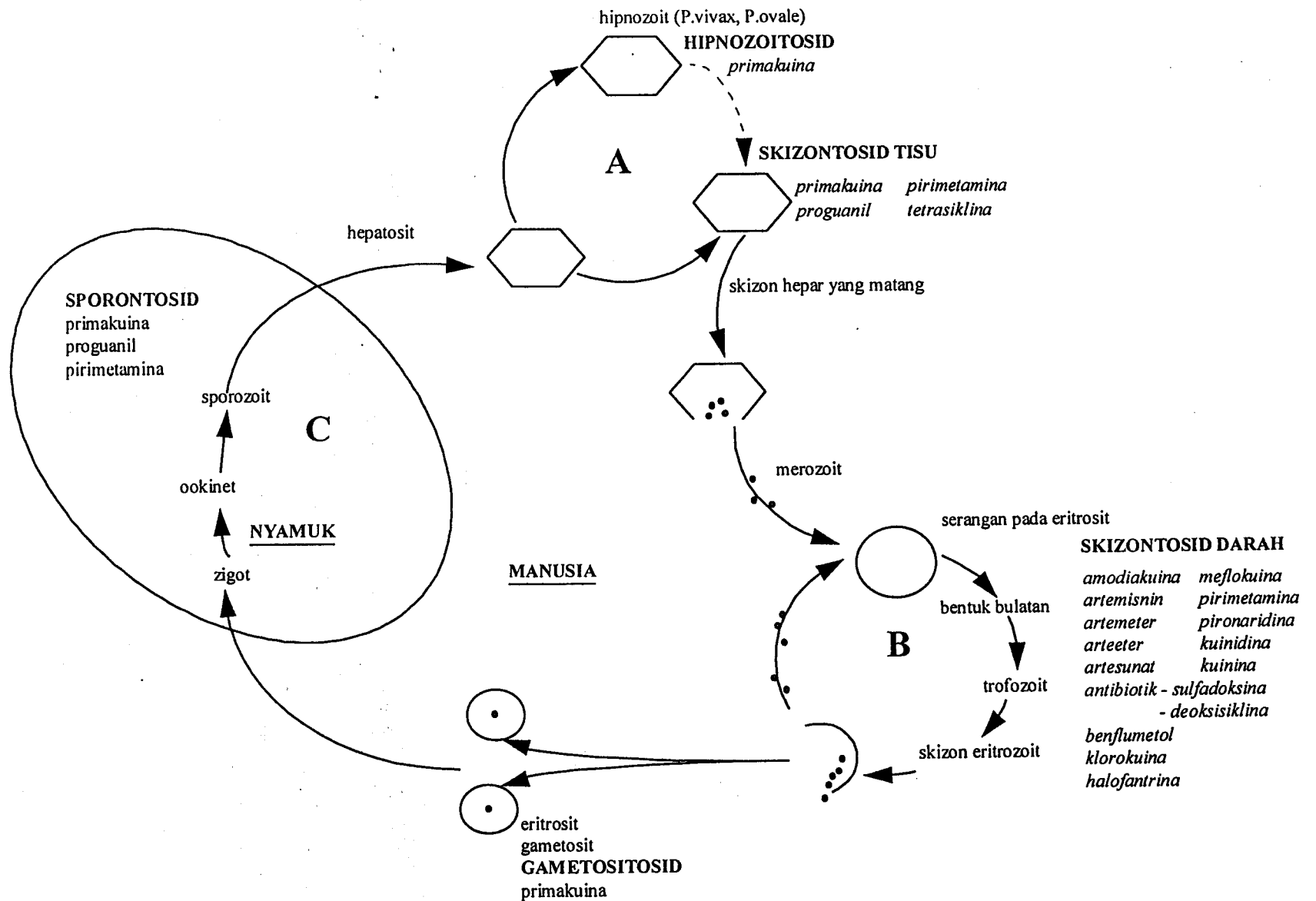
1.3 Patologi and kemoterapi malaria

1.3.1 Kitar hidup malaria

Penyakit malaria disebabkan oleh protozoa genus *plasmodium* dan disebarkan melalui gigitan nyamuk anopheles yang bertindak sebagai vektor. Terdapat empat *spesis plasmodium* yang menghasilkan malaria pada manusia. Tiap-tiap *spesis* menyebabkan corak demam yang berlainan. *P. ovale* menyebabkan malaria yang kurang

teruk sementara *P. vivax* pula menyebabkan malaria yang tidak begitu berbahaya di mana demam berlaku setiap 48 jam. *P. malariae* bertanggungjawab ke atas demam setiap 72 jam iaitu malaria yang dianggap tidak begitu berbahaya dan jarang terjadi. Ketiga-tiga *spesis plasmodium* ini jarang menyebabkan kematian. Tetapi *P. falciparum* menyebabkan malaria yang paling teruk dan boleh membawa maut. Ia juga merupakan *spesis* utama yang membentuk sifat rintangan terhadap drug antimalaria (Hudson, 1995).

Kitaran hidup dalam kesemua *spesis plasmodium* sama di antara satu sama lain dan ianya terbahagi kepada dua fasa utama. Fasa pertama ialah fasa seksual eksogenus yang berlaku di dalam nyamuk betina daripada genus *Anopheles* sementara fasa kedua pula berlaku di dalam manusia dan dikenali sebagai fasa aseksual endogenus. Rajah 1.1 menunjukkan beberapa peringkat kitar hidup *plasmodium*.



Rajah 1.1 Kitaran hidup parasit malaria dan tapak-tapak tindakan drug-drug antimalaria
 A = fasa skizogoni pra-eritrositik B = fasa skizogoni eritrositik C = fasa sporogonik

Fasa aseksual bermula apabila sporozoit yang terdapat di dalam kelenjar air liur nyamuk anopheles yang terjangkit memasuki saluran darah manusia melalui gigitan nyamuk tersebut. Kemudian sporozoit ini akan memasuki sel-sel parenkima hepar dan melalui satu kitar pembahagian aseksual yang dikenali sebagai peringkat pra-eritrositik untuk membentuk skizogoni tisu. Setiap skizon ini mengandungi beribu-ribu parasit yang dikenali sebagai merozoit. Merozoit-merozoit tersebut boleh menyerang sel-sel parenkima hepar yang lain, dan menjalani proses skizogoni buat kali yang keduanya dengan menghasilkan lebih banyak merozoit di dalam sel parenkima hepar. Setengah daripada merozoit, hasil daripada proses skizogoni yang pertama tadi, akan keluar dari hepar, dan menyerang masuk eritrosit serta melalui proses kitaran pembahagian aseksual yang seterusnya (peringkat eritrositik). Kemudian, di dalam eritrosit, setiap merozoit menjadi matang dan membentuk skizon yang mengandungi merozoit baru. Pada peringkat ini, pigmen malaria dihasilkan di antara parasit dengan memecahkan hemoglobin eritrosit. Kemudian pemecahan eritrosit dan pembebasan merozoit berlaku di mana merozoit bebas untuk menyerang eritrosit yang lain. Pemecahan eritrosit dikaitkan dengan demam dan tanda-tanda bermulanya penyakit malaria. Sebilangan kecil merozoit akan berkembang menjadi fasa seksual jantan dan betina iaitu gametosit jantan dan gametosit betina. Apabila gigitan berlaku sekali lagi, kedua-dua jantina gametosit akan memasuki perut anopheles untuk membentuk zigot. Zigot ini akan membahagi di bawah permukaan luar membran perut anopheles untuk menghasilkan sporozoit. Sporozoit ini akan bergerak ke kelenjar air liur dan menunggu masa untuk jangkitan melalui gigitan (Wahab, 1983).

1.3.2 Wujud semula dan rekrudesens

Penyakit malaria boleh wujud semula selepas beberapa bulan atau tahun setelah rawatan sepenuhnya dijalankan. Fenomena seperti ini biasa terjadi apabila seseorang pesakit dijangkiti oleh *P. vivax* dan *P. ovale*. Ini adalah kerana kedua-dua parasit tersebut mempunyai satu lagi peringkat eksoeritrositik sekunder atau hipnozoit. Hipnozoit ini dipercayai datang daripada sebilangan kecil sporozoit yang berkembang di

dalam hepar dan wujud dalam keadaan tidak aktif. Hipnozoit ini akan menjadi aktif dan melalui kitaran perkembangan serta membebaskan merozoit ke dalam saluran darah untuk menghasilkan kesan wujud semula (Krotoski, 1985).

Sifat rekrudesens malaria pula disebabkan oleh *spesis* yang tidak wujud semula iaitu *P. falciparum* dan *P. malariae*. Ia disebabkan oleh parasit jangkitan awal yang terselamat di peringkat eritrosit.

1.3.3 Pengelasan drug antimalaria

Drug antimalaria boleh dikelaskan mengikut pengelasan biologikal di mana pengkelasannya bergantung kepada tapak tindakannya ke atas peringkat-peringkat tertentu atau cara tindakan spesifiknya pada kitar hidup parasit malaria. Di sini pengelasan adalah mengikut garis panduan yang ditunjukkan oleh Bruce-Chwatt et al. (1986).

1. **Skizontosid tisu** menghalang ketumbuhan parasit di peringkat pra-eritrositik di dalam sel hepar. Di antara drug antimalaria yang mempunyai sifat ini ialah pirimetamina, proguanil dan 8-aminokuinolina primakuina. Primakuina didapati sangat toksik pada tahap dos terapeutik.
2. **Skizontosid tisu sekunder atau hipnozoitosid** bertindak sebagai anti wujud semula iaitu membunuh *P. ovale* dan *P. vivax* di peringkat tidak aktif di hepar supaya pemulihan radikal dapat tercapai. Hanya kumpulan 8-aminokuinolina sahaja yang berkesan ke atas manusia.
3. **Skizontosid darah** bertindak ke atas parasit di peringkat aseksual eritrositik. Tindakannya meliputi semua fasa kitar aseksual eritrositik. Drug yang termasuk di dalam kategori ini adalah alkaloid sinkona (kuinina dan kuinidina), klorokuina,

kuinolinametanol (meflokuina), fenantrenametanol (halofantrina), pirimetamina, proguanil dan terbitan artemisinin.

4. **Gametositid** memusnahkan peringkat seksual parasit di dalam darah. Hanya primakuina berkesan terhadap gametosit malaria *falciparum*. Kebanyakan skizontosid darah berkesan terhadap gametosit *P. vivax*, *P. ovale* dan *P. malariae*.

5. **Sporontosid** pula bertindak sebagai pencegah atau penghalang pembentukan oocysts dan sporozoit di dalam nyamuk. Pirimetamina, primakuina dan proguanil mempunyai sifat tindakan ini.

1.3.4 Vaksin malaria

Pengvaksinan adalah salah satu cara untuk mencegah dan mengawal malaria (Mclaren & Terry, 1989). Namun penyakit malaria merupakan kes khas kerana keimunan secara semulajadi hanya dapat bertahan untuk sementara waktu sahaja dan tidak sepenuhnya. Maka, kajian yang bertahun-tahun gagal untuk menghasilkan vaksin (Brown, 1994). Produk Colombia yang dikenali sebagai SPf66 merupakan vaksin malaria yang pertama dan juga vaksin pertama untuk penyakit parasitik pada manusia. SPf66 merupakan vaksin aktif pertama yang disintesis secara kimia. Ia dihasilkan berasaskan peptida sintetik yang menyerupai peptida parasit malaria *P. falciparum* (Patarroyo et al., 1988). Keputusan di Colombia menunjukkan vaksin ini dapat melindungi sebanyak 39 hingga 70 peratus daripada mereka yang menerimanya (Brown, 1994). Beberapa darjah perlindungan terhadap *P. falciparum* dan *P. vivax* telah dilaporkan. Walaubagaimanapun, percubaan ini mempunyai beberapa masalah metodologikal atau kadar serangan yang rendah, namun ia menunjukkan vaksin ini adalah selamat secara relatif (Nosten, 1996). Namun begitu data-data ini tidak mencukupi, maka percubaan klinikal yang lebih besar telah diadakan di Tanzania, Thailand dan Gambia. Di Tanzania, vaksin Colombia ini hanya dapat memberi perlindungan di tahap garisan sempadan bermakna (0-52%) (Alonso et al., 1994). Di

Gambia, tiada perlindungan diperhatikan (D'Alessandro et al., 1995). Di Thailand, percubaan yang lebih besar dan terperinci dengan vaksin formulasi US dijalankan di sempadan Barat-laut. Seramai 1349 kanak-kanak yang berumur di antara 2 hingga 15 tahun divaksin dengan GMP yang diperbuat daripada vaksin SPf66 atau vaksin Engerix-B. Kajian tersebut menunjukkan SPf66 adalah selamat dan immunogenik tetapi tidak memberikan perlindungan. Kajian lanjutan sedang dijalankan ke atas kanak-kanak Tanzania (Nosten et al., 1996).

Beberapa kumpulan penyelidik sedang mengkaji vaksin DNA dan keputusan yang didapati daripada model tikus malaria adalah sangat menggalakkan (Doolan & Hoffman, 1997). Walaubagaimanapun, di dalam primat, vaksin DNA didapati tidak terlalu immunogenik dan keselamatan jangkamasa panjang vaksin DNA belum dapat dipastikan (Gilbert & Hill, 1997).

Vaksin partikel protein pula mewakili sejenis vaksin baru dan hanya terdapat sedikit masalah keselamatan. Penumpuan kajian terdahulu adalah pada pengenalpastian antigen yang boleh dimasukkan dalam vaksin. Akan tetapi kaedah teknikal baru telah membawa kepada ketersediaan kebanyakan urutan protein daripada mikroorganisma yang boleh dijadikan antigen. Jika vaksin ini didapati berkesan di dalam kajian, ia akan digunakan oleh populasi di kawasan jangkitan malaria dan oleh pelancong ke kawasan tersebut (Gilbert & Hill, 1997).

1.4 Rintangan drug

Rintangan terhadap drug didefinisikan sebagai kebolehan sesuatu strain parasit untuk berganda atau berupaya untuk hidup di dalam kepekatan drug yang biasanya boleh memusnahkan atau menghalang penggandaan spesies tersebut (Bruce-Chwatt et al., 1986). Definisi ini juga diterangkan sebagai rintangan sepenuh iaitu kebolehan untuk bertahan di dalam dos maksimum yang boleh diambil oleh perumah mamalia

dengan tolerans yang baik. Kini kenyataan rintangan drug dikaitkan dengan rintangan sepeuh *P. falciparum* terhadap skizontosid darah.

Sejak tiga dekad kebelakangan ini, penyebaran populasi *P. falciparum* yang rintangan terhadap klorokuina berlaku dengan cepat di seluruh dunia dan hampir seiras dengan *spesis* itu sendiri (Bjorkman & Phillips-Howard, 1990). Kajian terkini di Nigeria Tenggara menunjukkan pengurangan kemujaraban klorokuina di mana kadar kegagalan sebanyak 60.5% dilaporkan di kalangan kanak-kanak yang dirawat dengan klorokuina (Falade et al., 1997) berbanding dengan kajian yang lepas yang hanya melaporkan 14.3% di kawasan tersebut (Salako et al., 1990a). Kawasan-kawasan jangkitan malaria rintangan-klorokuina yang lain di Asia Tenggara dan Afrika Timur juga menunjukkan corak yang sama (Falade et al., 1997). Baru-baru ini, terdapat kes yang melaporkan rintangan terhadap klorokuina oleh malaria vivax di Papua New Guinea (Schuurkamp et al., 1992). Lazimnya pesakit yang tidak sembuh daripada rawatan klorokuina akan dirawat dengan sulfadoksina-pirimetamina (SP) atau kuinina. Tetapi rintangan terhadap kombinasi ini telah dilaporkan di Asia Tenggara dan Amerika Selatan akibat penggunaan yang berlebihan (Wernsdorfer & Payne, 1991). Kajian terbaru di Nigeria Tenggara menunjukkan pengurangan kepekaan *plasmodium falciparum* terhadap SP (Falade et al., 1997), walaupun pada kajian terdahulu melaporkan kepekaan penuh terhadap SP di dalam negara itu (Salako et al., 1990a). *P. vivax* juga telah menunjukkan rintangan terhadap pirimetamina sejurus selepas drug tersebut diperkenalkan (Wernsdorfer, 1991). Maka rawatan kombinasi SP untuk malaria vivax gagal di kawasan tersebut. Tambahan pula sulfadoksina merupakan drug yang lemah bagi malaria vivax ini (WHO, 1984).

Laporan terawal mengenai *P. falciparum* yang rintang terhadap kuinina dilaporkan telah berlaku di Brazil pada tahun 1910. Walaupun demikian, penggunaan kuinina menjadi penting di kawasan di mana *P. falciparum* menunjukkan rintangan ke atas klorokuina dan kombinasi SP walaupun lazimnya ia digunakan sebagai agen

antimalaria barisan ketiga (Wernsdorfer & Payne, 1991). Faktor kesan sampingan iaitu sinkronisme pada kebanyakan pesakit dan kosnya tidak menggalakkan komplians serta menghadkan penggunaan kuinina secara meluas (Looareesuwan et al., 1996a; Ringwald et al., 1996a). Meflokuina diperkembangkan untuk rawatan penyakit falciparum malaria yang rintang pelbagai drug. Ia mempunyai tolerans yang lebih baik daripada kuinina (Looareesuwan et al., 1996a). Sejak kebelakangan ini, rintangan *P. falciparum* terhadap meflokuina telah dilaporkan di kawasan sempadan Thai-Cambodia dan di Afrika (Bjorkman & Phillips-Howard, 1990). Halofantrina merupakan drug baru yang mempunyai tolerans yang agak baik dan masih berkesan untuk rawatan malaria falciparum akut di Nigeria (Falade et al., 1997). Ini membuktikan kajian yang terdahulu di Nigeria (Salako et al., 1990b), tetapi pengurangan kemujaraban dapat diperhatikan pada kadar rekrudesens dan penyingkiran parasit yang tertunda di kalangan pesakit dalam jangkamasa lima tahun sejak ia diperkenalkan untuk kegunaan umum (Falade et al., 1997).

1.5 Farmakologi Pironaridina

Pironaridina, sejenis drug antimalaria yang baru, telah digunakan di Republik Rakyat China selama lebih daripada sepuluh tahun untuk merawat malaria dan didapati sangat berkesan terhadap *P. falciparum* dan *P. vivax* (Chang et al., 1992). Ia mujarab terhadap falciparum malaria yang rintangan terhadap klorokuina secara *in vitro* dan *in vivo* (Chang et al., 1992; Peters & Robinson, 1992). Kajian menyeluruh yang melibatkan beberapa ribu kes di Republik Rakyat China menunjukkan bahawa pironaridina adalah drug berpotensi tinggi dalam rawatan malaria termasuklah jangkitan yang rintang terhadap klorokuina (Looareesuwan et al., 1996a).

1.5.1 Sintesis Pironaridina

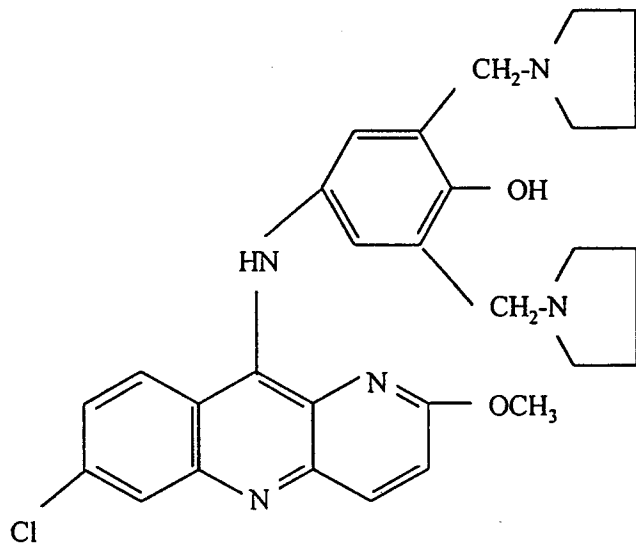
Pironaridina disintesis di Institut Penyakit Parasit Akademi Sains Perubatan Republik Rakyat China, Shanghai pada tahun 1970 (Zheng et al., 1982). Ia adalah terbitan benzonaftiridina dan nama kimianya ialah 2-metoksi-7-kloro-10[3',5'-bis

(pirolidil-1-metil)4'-hidroksianilino]-benzo[b]-1,5-naftiridina. Nama lain pironaridina ialah malaridina.

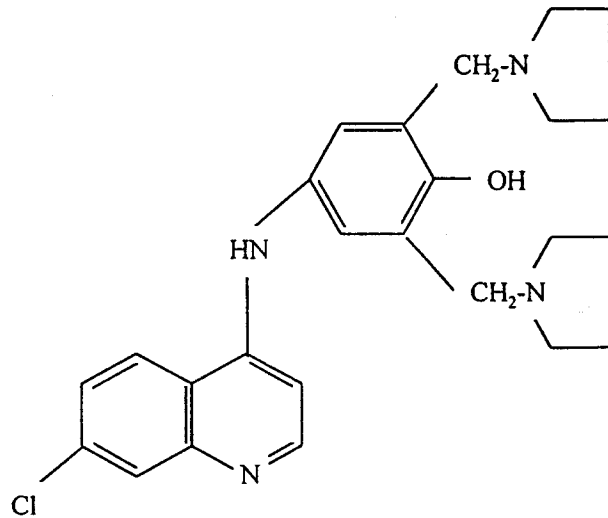
Sintesis pironaridina adalah berdasarkan kepada dua struktur drug antimalaria iaitu 7-kloro-4[3'5'-bis(pirolin-1-il-metil)4'-hidroksianilino]kuinolina atau lebih dikenali sebagai M6407 dan 2-metoksi-7-kloro-9-[(4'-N' N'-dietil-1-metilbutana) anilino] benzo[b]-1,5-naftiridina atau azakrin seperti yang ditunjukkan dalam rajah 1.2 (Zheng et al., 1982; Saleh & Loh, 1991). Keaktifan drug M6407 ditingkatkan dengan kehadiran aminofenol yang mempunyai dua kumpulan pirolidil-metil dan ia menunjukkan kesan ketoksikan yang rendah berbanding dengan klorokuina. Memandangkan sebilangan parasit malaria menunjukkan rintangan terhadap klorokuina dan mepakrina, gelang yang berlainan jenis iaitu azakrin dicadangkan untuk pironaridina. Oleh yang demikian pironaridina dikelaskan di dalam kumpulan 9-aminoakridina bersama azakrin (Zheng et al., 1982).

Langkah-langkah utama sintesis pironaridina (Zheng et al., 1982) telah diringkaskan dalam rajah 1.3. Bahan-bahan pemula yang digunakan untuk mensintesis pironaridina ialah asid 2,4-diklorobenzoik dan 5-amino-2-metoksipiridina. Bahan-bahan pemula ini akan bertindakbalas melalui proses kondensasi menghasilkan 2-metoksi-5(2-karboksi-5-kloroanilino) piridina yang disiklikkan dengan menggunakan reagen fosforus oksiklorida. Ini akan menghasilkan 2-metoksi-7,10-diklorobenzo[b],1 5-naftiridina yang berkondensasi dengan 4-aminofenol untuk membentuk 2-metoksi-7-kloro-10(4-hidroksianilino)benzo[b],1,5-naftiridina. Seterusnya hasil ini bertindakbalas dengan reagen Mannich menghasilkan pironaridina.

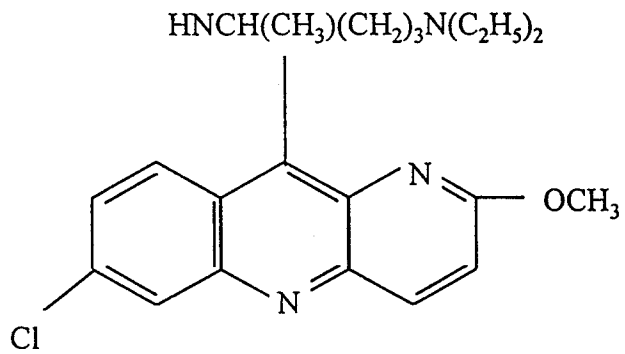
Pironaridina



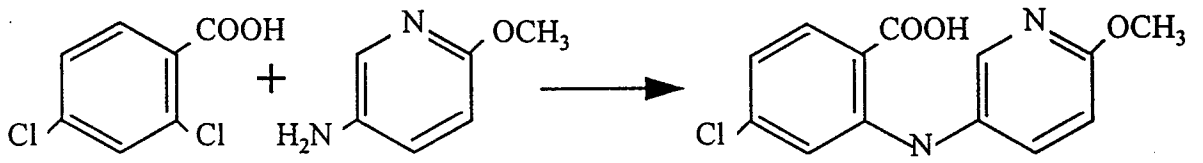
M6407



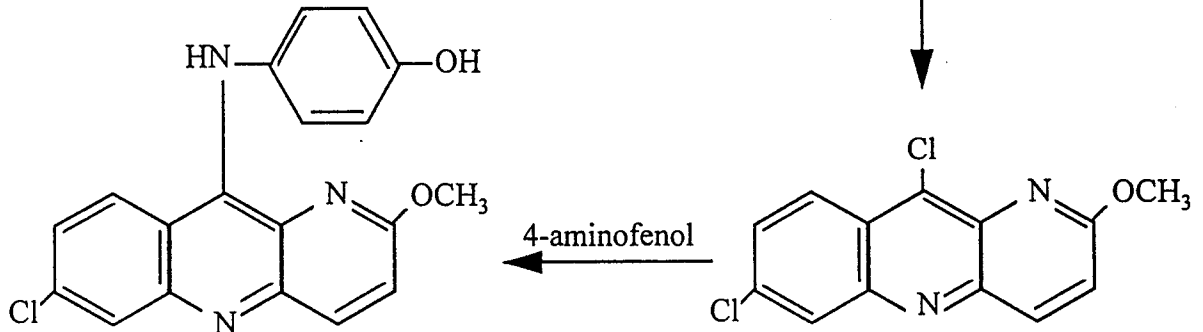
Azakrin



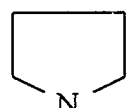
Rajah 1.2 Struktur drug antimalaria



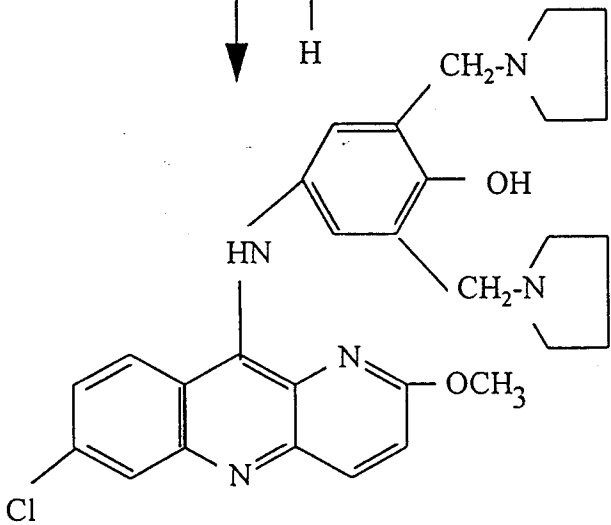
POCl₃



HCHO



Dalam etanol



pironaridina

Rajah 1.3 Langkah-langkah utama sintesis pironaridina

1.5.2 Sifat kimia Pironaridina

Sifat-sifat yang dinyatakan di bawah adalah seperti yang dilaporkan oleh Institut Penyakit Parasit Akademi Sains Perubatan China, Shanghai. Pironaridina tetrafosfat bersifat hidroskopik, tiada bau, berwarna kuning dan pahit rasanya. Ia larut di dalam air, kurang larut di dalam etanol dan tidak larut di dalam kloroform, eter dan pelarut organik lain. Pironaridina tetrafosfat mengandungi empat kumpulan fosfat dan kandungan bes pironaridina di dalam garam fosfat ialah 56.89%. Formula molekulnya ialah $C_{29}H_{32}ClN_5O_2 \cdot 4H_3PO_4$ dan ia mempunyai takat lebur (decomposed) pada julat di antara 233-236°C (Zheng et al., 1982; Shao, 1990; Chang et al., 1992).

1.5.3 Perkembangan pra-klinikal

1.5.3.1 Kemujaraban ke atas parasit malaria di dalam model haiwan

Kajian aktiviti skizontosidal pironaridina ke atas tikus yang dijangkitkan *P. berghei* secara eksperimen telah dijalankan (Fu & Xiao, 1991; Chang et al., 1992). Didapati dos keberkesanan terhadap 50% subjek (ED_{50}) ialah 6.8 ± 1.4 mg/kg bagi dos oral tunggal dan 4.97 ± 0.65 mg/kg bagi dos intraotot tunggal, sementara nilai-nilai tersebut bagi klorokuina ialah 45.6 ± 6.2 mg/kg dan 30.89 ± 5.8 mg/kg masing-masing. Maka indeks terapeutik (LD_{50}/ED_{50}) bagi pironaridina berbanding dengan klorokuina adalah 13.9 kali lebih besar untuk dos oral dan 17.4 kali lebih besar bagi dos intraotot masing-masing.

Institut Penyelidikan Walter Reed Army, Washington DC, USA telah menjalankan ujian bebas ke atas pironaridina. Ia diberikan kepada tikus melalui suntikan di bawah kulit. Didapati pironaridina aktif bertindak ke atas *P. berghei* dengan mencapai pemulihan pada 20 mg/kg dan semua dos yang lebih tinggi (Chang et al., 1992). Satu kajian perbandingan aktiviti pironaridina ke atas *P. berghei* menunjukkan aktiviti pironaridina lebih tinggi daripada artesunate, artemisinin, meflokuina, piperakuina dan hidropiperakuina. Indeks rintangan untuk kesemua drug tersebut

adalah lebih tinggi daripada pironaridina (Chang et al., 1992). Pironaridina didapati berkesan pada dos yang lebih rendah berbanding dengan amodiakuina, meflokuina dan qinghaosu dalam merawat tikus yang dijangkiti *plasmodium berghei* yang peka-drug dan *plasmodium berghei* yang sederhana rintangan-klorokuina. Amodiakuina, meflokuina dan qinghaosu menunjukkan rintangan-silang pada *plasmodium berghei* yang rintang terhadap pironaridina. Ini menekankan kegunaan pironaridina sahaja untuk rawatan malaria falciparum mestilah pada dos yang tertentu (Shao et al., 1992).

Pironaridina menunjukkan kesan skizontosidal yang jauh lebih lama daripada klorokuina. Dos pironaridina sebanyak 10 mg/kg (lebih kurang 1.47 ED₅₀) diberi enam hari sebelum inokulasi dengan *P. berghei* berjaya mencegah pertumbuhan parasit sementara 67 mg/kg dos klorokuina (lebih kurang 1.47 ED₅₀) hanya dapat mencegah jika ia diberikan dua hari sebelum inokulasi. *P. berghei* yang rintang terhadap klorokuina adalah peka terhadap pironaridina. Ini menunjukkan tiada rintangan-silang berlaku di antara kedua-dua drug ini (Shao, 1990). Pada monyet "rhesus", ia adalah lebih berkesan daripada klorokuina dalam menentang *P. inui*, *P. cynomologi* dan *P. knowlesi* (Fu & Xiao, 1991). Dos tunggal sebanyak 36 mg/kg telah menyembuhkan dua daripada tiga ekor monyet (*macaca mulatta*) yang dijangkiti *P. inui* tetapi menunjukkan rekrudesen 11-13 hari selepas rawatan. Pada monyet yang dijangkiti *P. cynomologi*, tiga daripada empat ekor monyet berjaya disembuhkan pada dos 6 mg/(kg.d) x 3. Apabila 3 mg/kg pironaridina dalam bentuk larutan garam diberi secara intravena(iv) kepada tiga ekor monyet untuk jangkamasa satu jam, parasitemia menjadi negatif pada 73, 75 dan 97 jam masing-masing selepas dos diberikan. Walaubagaimanapun tiga ekor monyet yang lain yang diberi klorokuina secara intravena menunjukkan kadar penyingkiran parasit yang agak perlahan iaitu 93, 96 dan 102 jam. Kesan skizontosidal yang sangat baik juga ditunjukkan apabila dos pironaridina sebanyak 1.5 atau 2 mg/kg diberikan secara intraotot. Pironaridina tidak memperlihatkan sebarang tindakan ke atas skizon tisu *P. yoelii* pada tikus dan *P. cynomologi* pada monyet (Shao, 1990).

Kajian *in vitro* di Sweden dan kajian klinikal di Republik Rakyat China telah mengesahkan bahawa pironaridina menunjukkan keaktifan yang tinggi terhadap kedua-dua jenis parasit yang peka kepada klorokuina dan yang rintang kepada klorokuina (Fu et al., 1986). Kajian secara *in vitro* dan juga di dalam model haiwan membuktikan bahawa pironaridina aktif terhadap parasit malaria yang rintang terhadap klorokuina (Childs et al., 1988; Basco & Lebras, 1992; Peters & Robinson, 1992). Nilai ED₅₀ adalah 1.3 dan 2.1 ng/ml terhadap strain yang peka-klorokuina (Camp) dan strain yang rintang terhadap klorokuina (Vietnam Smith) masing-masing. Indeks rintangannya adalah 1.6 untuk klorokuina 2.7 ng/ml untuk strain Camp dan 48.3 ng/ml untuk strain Vietnam Smith (WHO, 1990).

Tahap aktiviti antimalaria pironaridina yang tinggi juga dilaporkan di Thailand (Childs et al., 1988). Kajian aktiviti antimalaria terhadap *P. falciparum* yang rintangan terhadap pelbagai drug menunjukkan bahawa *P. falciparum* yang diasingkan daripada timur dan utara Thailand mempunyai 50% kepekatan penghalang (IC₅₀) sebanyak 10.1 nM dan 8.4 nM masing-masing. Oleh kerana ia mempunyai keaktifan yang tinggi secara *in vitro*, ia dapat dibandingkan dengan meflokuina (Childs et al., 1988) dan tidak menunjukkan rintangan-silang dengan antimalaria 4-aminokuinolina dan kuinolinametanol (Fu & Xiao, 1991). Maka pironaridina berpotensi sebagai agen untuk rawatan malaria khususnya jangkitan yang rintang terhadap klorokuina (Warsame et al., 1991). Satu lagi kajian aktiviti antimalaria menunjukkan dua klon dari rujukan *P. falciparum*, D-6 Afrika dan W-2 Indochina mempunyai IC₅₀ yang rendah (Childs et al., 1988).

Pironaridina menyebabkan perubahan penting berlaku di dalam kompleks berpelikel intraeritrositik trofozoit pada strain *P. berghei* yang peka dan rintang terhadap klorokuina di dalam tikus dan pada strain *P. falciparum* pula di dalam eritrosit manusia yang dikulturkan secara *in vitro*. Klorokuina dan meflokuina tidak menunjukkan apa-apa perubahan secara perbandingan (Wu et al., 1988; Chang et al., 1992).

Baru-baru ini juga beberapa kajian *in vitro* telah dijalankan ke atas keberkesanan pironaridina terhadap strain *P. falciparum* dari Afrika dan Cambodia (Basco & Lebras, 1992, 1994). Hasil kajian menunjukkan pironaridina mempunyai keaktifan yang sangat tinggi terhadap strain *P. falciparum* yang rintang terhadap klorokuina dan yang diperolehi daripada kawasan geografi yang berbeza (Alin et al., 1990; Basco & Lebras, 1992).

1.5.3.2 Toksikologi

Dalam kajian ketoksikan akut pada tikus, LD₅₀ iaitu dos kematian terhadap 50% subjek yang dilaporkan bagi pironaridina ialah 1369 ± 234 mg/kg bagi dos oral tunggal dan 250.6 ± 33.1 mg/kg bagi dos intraotot tunggal. Sementara nilai-nilai tersebut bagi klorokuina ialah 663.4 ± 76.7 mg/kg dan 89.7 ± 34.0 mg/kg masing-masing (Chang et al., 1992). Dos kematian minimum (MLD) pironaridina bagi intraotot di dalam arnab ialah 80 mg/kg, dengan klorokuina pula nilainya adalah 20 mg/kg. Tiga daripada lima ekor arnab mati pada dos intraotot tunggal sebanyak 80 mg/kg klorokuina, sementara hanya seekor sahaja yang mati dengan pironaridina (Shao, 1990; Fu & Xiao, 1991). Di dalam anjing nilai MLD intraotot pironaridina ialah 60 mg/kg berbanding 10 mg/kg dengan klorokuina (Shao, 1990). Daripada lima ekor anjing yang dirawat dengan dos tunggal intraotot sebanyak 60 mg/kg pironaridina, seekor mati dan dua ekor menunjukkan kesan ketoksikan. Walaubagaimanapun, dengan dos 40 mg/kg atau dos yang lebih rendah, tiada kesan sampingan diperhatikan. Dua ekor anjing yang diberi 20 mg/kg klorokuina di bawah eksperimen yang sama mati dalam masa 30 minit (Fu & Xiao, 1991). Tiada kesan sampingan diperhatikan wujud pada monyet "rhesus" yang diberi pironaridina secara intragastrik pada dos 240 mg/kg selama tiga hari (Fu & Xiao, 1991). Secara keseluruhannya, pironaridina menunjukkan ketoksikan yang lebih rendah daripada klorokuina apabila diberi secara oral dan intraotot kepada tikus, arnab dan monyet.

Jika dikaji dari segi ketoksikan subakut, tiga daripada limabelas ekor tikus yang menerima dos oral sebanyak 200 mg/kg setiap hari selama empatbelas hari mati. Tikus yang lain mengalami kekurangan berat badan. Di dalam ujikaji lain lima ekor arnab diberi dos 10 mg/kg pironaridina secara intravena selama satu jam, dua dos pada hari pertama dan satu dos setiap hari bermula dari hari kedua hingga hari ketujuh. Tiada perubahan abnormal diperhatikan pada elektrokardiogram, serum glutamate phosphotransferase dan pada ujian darah dan air kencing. Tetapi seekor daripada lima ekor arnab mati apabila menerima dos yang sama bagi klorokuina pada hari keempat (Shao,1990).

Di dalam ujikaji yang lain, dua kumpulan anjing; dua ekor dalam setiap kumpulan diberikan 12 mg/(kg.d) dan 24 mg/(kg.d) pironaridina untuk sebulan secara oral. Pemeriksaan ke atas fungsi hepar dan renal serta ECG tidak menunjukkan apa-apa perubahan. Apabila menerima 24 mg/(kg.d) klorokuina, dua ekor anjing mati pada hari kelima dan keempatbelas. Dua ekor lagi yang menerima 12 mg/(kg.d) mati pada hari kelapan dan ketigapuluh (Shao, 1990).

Ketoksikan kardiovaskular selepas suntikan intravena telah dikaji di dalam arnab dan anjing yang telah dilalikan. Didapati nilai dos toksik kumulatif untuk pironaridina ialah 39.8 ± 9.3 mg/kg berbanding 11.4 ± 3.1 mg/kg dengan klorokuina di dalam arnab. Nilai dos kematian pironaridina adalah 64.6 ± 10.1 mg/kg sementara klorokuina ialah 20.7 ± 3.8 mg/kg. Di dalam anjing pula nilai dos toksik kumulatif pironaridina dan klorokuina ialah 97.8 ± 18.7 mg/kg dan 28.8 ± 4.4 mg/kg masing-masing. Keputusan ini menunjukkan bahawa klorokuina mempunyai kesan toksik yang lebih kuat berbanding dengan pironaridina dalam merendahkan tekanan darah (Shao, 1990; Chang et al., 1992). Ketoksikan khusus seperti aktiviti mutagenik dikesan ke atas *Salmonella typhimurium* (strain TA 1537) sahaja (Chang et al., 1992). Di dalam ujian mikronukleus tikus, pironaridina tidak memusnahkan struktur kromosom atau alatan gelendong pada takat dos kematian (Shao, 1990). Ia juga tidak mempunyai kesan ke

atas barisan sel Chinese hamster fibroblast dan ke atas rangka tulang kedua-dua progeneri F₁ dan F₂ pada tikus (Shao, 1990; Fu & Xiao, 1991). Tiada kesan teratogenik dan fototoksik diperhatikan pada tikus (Shao, 1990; Chang et al., 1992).

1.5.4 Aspek klinikal

Kesemua kajian-kajian yang dijalankan menunjukkan bahawa pironaridina mempunyai kesan terapeutik terhadap kedua-dua *P. falciparum* yang rintangan terhadap klorokuina dan yang peka-klorokuina. Lagipun sehingga kini tiada kesan ketoksikan yang bermakna dilaporkan pada subjek manusia.

1.5.4.1 Tolerans

Dos pironaridina yang dicadangkan untuk rawatan malaria pada manusia di dapati selamat dengan tiada kesan sampingan (Fu & Xiao, 1991; Chang et al., 1992). Kesan sampingan yang ditunjukkan adalah tidak serius dan jarang berlaku. Pesakit mempunyai tolerans yang baik terhadap pironaridina. Hanya segelintir pesakit saja yang dirawat secara oral mengadu tentang kesan sampingan seperti cirit-birit, kesakitan abdomen yang ringan, rasa mual dan alergik kulit (ruam panas). Pesakit yang mengadu tentang ruam panas, dirawat dengan klorfeniramina (chlorpheniramine) dan sembuh selepas dua hari. Pada dos yang tinggi, cuma sebilangan kecil kes sahaja mengalami perubahan pada elektrokardiogram yang ringan (Xu et al., 1982; Chang et al., 1992).

Peratus pesakit yang mengalami kesan sampingan adalah 38% berbanding dengan 56% yang dirawat dengan klorokuina (Fu & Xiao, 1991). Selepas pemberian dos secara intraotot, terdapat beberapa kes gangguan gastro-usus, sedikit kegatalan setempat dialami di bahagian suntikan tetapi "necrosis" tidak berlaku. Melalui pemberian intravena, tiada kesan sampingan yang ketara diperhatikan (Fu & Xiao, 1991; Shao, 1990). Pada regimen dos terapeutik pironaridina, tolerans yang baik dilaporkan di kalangan pesakit. Lebih daripada 10 pesakit malaria yang hamil di

peringkat umur pertengahan dan tua sembuh tanpa apa-apa kesan sampingan pada fetus atau bayi apabila dirawat dengan pironaridina (Shao, 1990).

Di dalam kajian yang terkini, pironaridina dengan jumlah dosnya sebanyak 1,200 dan 1,800 mg yang diberikan selama tiga dan lima hari masing-masing menunjukkan tolerans yang baik di kalangan pesakit tanpa kesan sampingan yang serius (Looareesuwan et al., 1996a). Dalam kajian yang lain pula, tiada kesan sampingan serius yang diperhatikan. Ianya serupa dengan kajian di Republik Rakyat China yang melaporkan pruritus (kegatalan), kebanyakannya di kalangan pesakit yang berkulit hitam. Pada dos yang tinggi, tolerans yang baik dengan kesan sampingan yang ringan yang hanya memerlukan rawatan klorfeniramina atau aspirin dilaporkan. Beberapa kes kesakitan abdomen yang ringan, besar kemungkinan disebabkan oleh aspirin juga dilaporkan. Peratus kesan sampingan yang dilaporkan adalah 55% pada dos yang tinggi (Ringwald et al., 1996a). Ini menunjukkan kesan sampingan berkait rapat atau bergantung kepada dos (Looareesuwan et al., 1996a).

1.5.4.2 Kemujaraban

Di antara tahun 1971 dan 1974 lebih daripada 1000 kes telah dirawat dengan pironaridina di Republik Rakyat China. Semenjak itu, kajian menyeluruh ke atas rawatan malaria telah dijalankan dengan meluas. Di dalam tahun 1980, pironaridina dirasmikan secara formal sebagai drug antimalaria yang baru untuk kegunaan di Republik Rakyat China (Chang et al., 1992). Di dalam rawatan *P. falciparum* yang rintangan terhadap klorokuina, purata masa yang diambil untuk mengurangkan demam ialah 36 jam dan purata masa untuk menyingkirkan parasit adalah 57 jam. Pemberian secara intraotot atau intravena mengurangkan demam dengan pantas jika dibandingkan dengan rawatan secara oral (Fu & Xiao, 1991). Empat puluh kes pesakit yang mengalami malaria serebral yang serius dengan demam tinggi atau yang mengalami malaria di peringkat akhir kehamilan berjaya disembuhkan oleh pironaridina. Di dalam kes tersebut, demam dikurangkan dalam masa purata sebanyak 48 jam dan masa

purata untuk penyingkiran parasit pula ialah 72 jam (Xu et al., 1982; Pyronaridine Research Cooperative Group, 1985). Ia adalah lebih cepat berbanding dengan klorokuina (Fu & Xiao, 1991). Di Indonesia, penyembuhan radikal terhadap jangkitan *P. falciparum* yang rintangan terhadap pelbagai drug telah dicapai (Chang et al., 1992).

Baru-baru ini dua cubaan klinikal telah dijalankan ke atas subjek dewasa yang dijangkiti malaria *P. falciparum* di Cameroon (Ringwald et al., 1996b) dan Thailand (Looareesuwan et al., 1996a). Di Cameroon peratusan pemulihan untuk pironaridina adalah 100% di kalangan empat puluh pesakit dengan jumlah dos sebanyak 32 mg/kg selama tiga hari. Dengan klorokuina sebagai drug perbandingan peratusan pemulihan adalah 44% sahaja. Di Thailand dua regimen pironaridina iaitu jumlah dos purata 25.6 mg/kg selama tiga hari dan 36.7 mg/kg selama lima hari mencapai peratusan pemulihan sebanyak 63% dan 88% masing-masing. Keputusan 88% ini agak baik jika dibandingkan dengan drug antimalaria yang lain (digunakan tanpa kombinasi) di Hospital Tropical Diseases, Bangkok. Dalam kajian terkini, artesunate dengan jumlah dos sebanyak 600 mg selama lima hari memberikan peratusan pemulihan 88% dan artemether dengan jumlah dos 500 mg secara oral selama lima hari menghasilkan kadar pemulihan 74%. Meflokuina dengan jumlah dos sebanyak 1,250 mg menyembuhkan hanya 81% pesakit di dalam hospital yang sama (Looareesuwan et al., 1992a, 1992b, 1996b).

Kes rekrudesens tidak dapat dielakkan dalam kebanyakan rawatan malaria. Peratusan rekrudesens pironaridina sebanyak 10% diperhatikan dengan malaria *falciparum* semasa sebulan selepas rawatan (Chang et al., 1992). Di Thailand pula, peratusan rekrudesens untuk rawatan selama tiga hari dengan dos sebanyak 1,250 mg adalah lebih tinggi berbanding dengan rawatan selama lima hari dengan jumlah dos sebanyak 1,800 mg. Peratusan rekrudesens untuk dos 1,800 mg adalah 12% (Looareesuwan et al., 1996a). Kemungkinan peratusan rekrudesens yang tinggi ini dapat dikurangkan dengan rawatan kombinasi pironaridina dengan drug antimalaria

yang lain. Beberapa kajian telah dijalankan. Di antara yang didapati berkesan ialah kombinasi drug pironaridina dengan sulfadoksina dan pirimetamina dengan dua regimen iaitu jumlah dos 800 mg pironaridina, 100 mg sulfadoksina dan 50 mg pirimetamina yang dibahagikan kepada dua dos di mana satu dos setiap hari selama dua hari atau dos oral tunggal pironaridina (500 mg), sulfadoksina (1000 mg) dan pirimetamina (50 mg) digunakan. Ia mencapai peratus pemulihan 100% dan tiada rekrudesens berlaku semasa duapuluhlapan hari selepas rawatan (Shao et al., 1989; Chang et al., 1992). Dalam kajian kombinasi lain juga, peratus pemulihan 100% dilaporkan di Hainan. Kadar rekrudesens dalam masa sebulan selepas rawatan adalah 2.5% untuk dos rendah dan 6.5% untuk dos tinggi (pironaridina (1200 mg), sulfadoksina (1500 mg) dan primakuina (67.5 mg)) (Chang et al., 1992).

Oleh yang demikian pironaridina menunjukkan potensi yang tinggi dalam rawatan malaria falciparum yang rintang terhadap pelbagai drug dan merupakan calon yang baik untuk terapi kombinasi dengan drug antimalaria yang lain. Selanjutnya, kajian tentang kombinasi yang sesuai dengan komponen antimalaria lain diperlukan untuk mengoptimumkan kemujaraban dan keselamatan pironaridina (Looareesuwan et al., 1996a).

Kesan terapeutik pironaridina ke atas pesakit malaria vivax selepas suntikan intraotot menunjukkan masa yang diambil untuk meredakan demam dan menyingkirkan parasit adalah lebih pendek daripada pemberian oral dan intravena (Fu & Xiao, 1991). Di dalam satu kajian seramai 117 pesakit malaria vivax telah dirawat dengan pironaridina. Selepas sebulan, 11% rekrudesens dilaporkan (Pyronaridine Research Cooperative Group, 1985). Kombinasi pironaridina dan primakuina telah digunakan di cubaan klinikal di Jiangsu dan Wilayah Shangdong, Republik Rakyat China. Jumlah dos sebanyak 1,200 mg pironaridina dengan 90 mg primakuina yang dibahagikan kepada empat dos, satu dos setiap hari selama empat hari digunakan untuk merawat malaria vivax. Peratusan pemulihan yang segera iaitu 100% diperolehi. Selepas 8-10

bulan peratusan wujud semula adalah rendah manakala kadar pemulihan radikal melebihi 90% dicapai (Chang et al., 1992).

1.5.4.3 Regimen dos terapeutik

Kepekatan penghalang minimum (MIC) pironaridina dalam *P. falciparum* masih berada di dalam julat regimen dos terapeutik yang boleh dicapai dengan formulasi drug yang sesuai. Oleh kerana kekurangan data farmakokinetik, regimen yang dipilih adalah secara empirikal. Sehingga kini cubaan klinikal yang telah dijalankan (Looareesuwan et al., 1996a; Ringwald et al., 1996a) adalah berasaskan regimen dos penyelidikan-penyelidikan di Republik Rakyat China. Jumlah dos oral adalah 1.2 g yang dibahagikan kepada tiga atau empat dos, dua dos pada hari pertama dan diikuti dengan yang lain untuk satu atau dua hari. Jumlah dos melalui suntikan intraotot atau infusi intravena adalah 0.3 g yang dibahagikan kepada dua dos dengan julat masa selama lapan jam (Pyronaridine Research Cooperative Group, 1985; Fu & Xiao, 1991).

Didapati ketersediaan biologi oral adalah rendah berbanding dengan pemberian dos secara intraotot. Formulasi tablet yang disaluti mempunyai ketersediaan biologi yang lebih rendah daripada kapsul pironaridina (Feng et al., 1987). Maka kemungkinan besar keputusan terapeutik yang lebih baik boleh dicapai dengan formulasi drug oral dengan ketersediaan biologi yang tinggi. Seterusnya, ia dapat membuka jalan untuk regimen dos yang lebih rasional (Looareesuwan et al., 1996b).

1.5.5 Kaedah analisis

Secara umum, setiap kaedah analisis yang digunakan di dalam kajian farmakokinetik mestilah cukup peka dan mempunyai kepilihan yang tinggi. Walaubagaimanapun, adakalanya sesuatu kaedah itu tidak cukup peka dan mempunyai kepilihan tinggi atau mudah penggunaannya. Ini merumitkan pembelajaran farmakologi klinikal drug tersebut serta penggunaan drug tersebut secara optimum dalam rawatan malaria. Kaedah-kaedah analisis yang telah digunakan untuk penentuan pironaridina

dalam bendalir biologi termasuklah kaedah spektrofotometri dan dua kaedah kromatografi cecair keupayaan tinggi yang menggunakan pengesanan elektrokimia dan pengesanan ultralembayung. Kaedah-kaedah tersebut diringkaskan dalam jadual 1.1.

Kaedah yang paling awal ialah kaedah spektrofotometri yang diamalkan di Republik Rakyat China (Feng & Wang, 1986). Kaedah ini telah digunakan di dalam kajian farmakokinetik untuk menentukan parameter-parameter farmakokinetik yang terawal. Walaupun kaedah ini peka, ia mempunyai beberapa kelemahan. Di antaranya yang paling ketara ialah kaedah pengesananannya. Kaedah pendarflour yang digunakan ini tidak mempunyai kepilihan tinggi dan merupakan kaedah lama di mana ia terpaksa dilakukan dengan kehadiran bendasing yang mungkin mengganggu analisis.

Kaedah kromatografi cecair keupayaan tinggi dengan pengesanan ultralembayung merupakan pilihan popular dalam perkembangan sesuatu kaedah kromatografi. Kaedah kromatografi cecair keupayaan tinggi dengan pengesanan ultralembayung telah dilaporkan (Saleh & Loh, 1993). Kaedah tersebut mengesan pironaridina pada panjang gelombang serapan 278 nm. Kaedah ini tidak cukup peka kerana had pengesanan yang dilaporkan adalah sangat tinggi untuk analisis pironaridina di dalam sampel plasma yang diperolehi daripada kajian farmakokinetik klinikal.

Kaedah kromatografi cecair keupayaan tinggi dengan pengesanan elektrokimia (Wages et al., 1990), didapati lebih peka daripada kaedah pertama tadi. Had pengesananannya adalah 20 ng/ml. Tetapi pengesanan elektrokimia adalah mahal dan keperluan keadaan yang bebas-oksigen di dalam fasa gerak dan sampel menjadi kelemahan utama kaedah ini.

Sehingga kini, teknik kromatografi cecair keupayaan tinggi masih menjadi pilihan utama. Kaedah kromatografi cecair keupayaan tinggi dengan pengesanan yang mempunyai kepilihan tinggi, peka, keterpercayaan yang tinggi dan ekonomi diperlukan.