Scientia Pharmaceutica (Sci. Pharm.) **72**, 109–120 (2004)

© Österreichische Apotheker-Verlagsgesellschaft m.b.H., Wien, Printed in Austria

Abbauprodukte von Amiloridhydrochlorid

Klaus Görlitzer * [1], Silke Huth [1],
Edith Gößnitzer [2] und Winfried Wendelin [2]

[1] Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig, Beethovenstraße 55, D-38106 Braunschweig,
[2] Institut für Pharmazeutische Chemie und Pharmazeutische Technologie der Karl-Franzens-Universität Graz, Schubertstraße 1, A-8010 Graz

Zusammenfassung

Erhitzen von Amiloridhydrochlorid (**1** • **HCl**) in Acetatpuffer *p*H 4.6 führte zu Amiloridacetat (**1** • **AcOH**), dem Pyrazindiamin **6** und dem Acylureid **7**. Das Pteridinon **3** wurde beim Erhitzen von **1** • **HCl** in DMF unter Rückfluß erhalten.

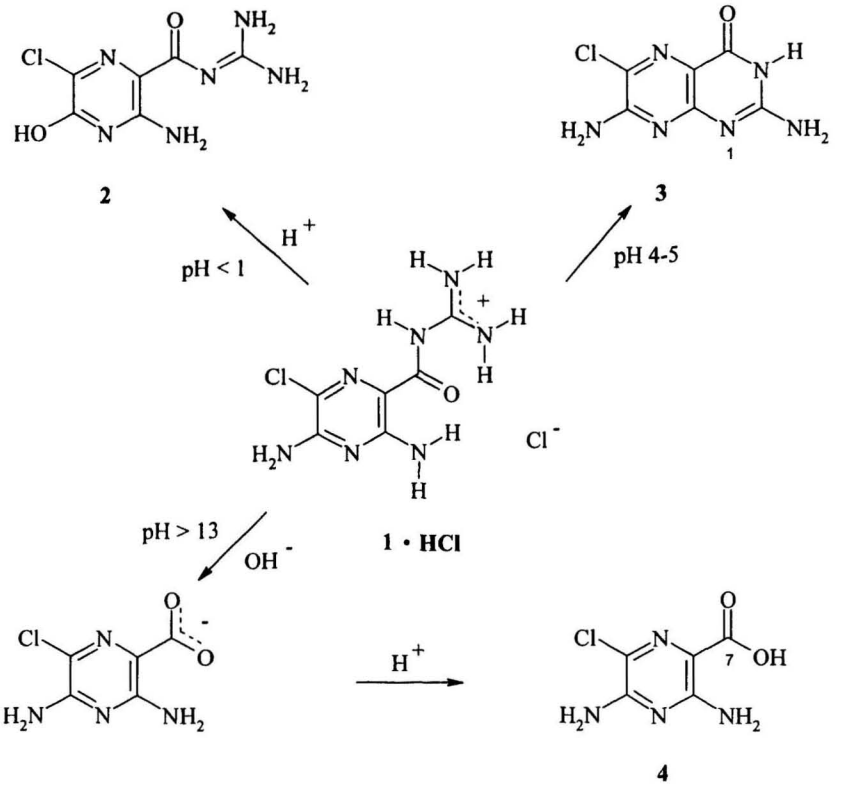
Schlagwörter

Amiloridhydrochlorid; Abbauprodukte; 6-Chlor-2,7-diamino-4(3*H*)-Pteridinone.

Einleitung

Nach Mazzo [1] entstehen aus dem kaliumsparenden Diureticum Amiloridhydrochlorid (**1** • **HCl**) [2] in wässriger Lösung bei erhöhten Temperaturen und verschiedenen *p*H-Werten drei Abbauprodukte. Durch saure Hydrolyse bei *p*H < 1 überwiegt die 6-Hydroxy-Verbindung **2** [3], bei *p*H ~ 5 sind das Pteridin-Derivat **3** und die Carbonsäure **4** [4] vorhanden,

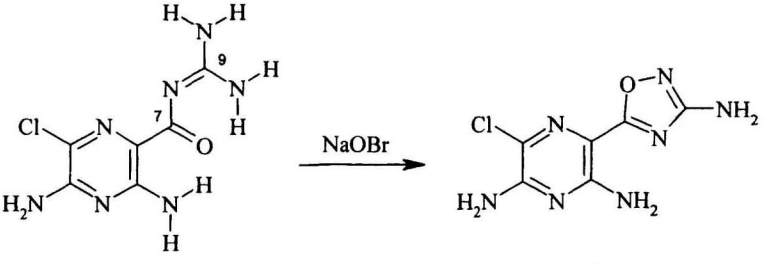
während in alkalischer Lösung (*p*H > 13) das Anion von **4** vorherrscht (Schema 1).



Schema 1: Abbauprodukte von Amiloridhydrochlorid (**1 · HCl**) in wässriger Lösung [1]

Spektroskopische und analytische Daten für das Pteridinon **3** liegen nicht vor. Unser Interesse an dem Pteridinon **3** wurde ursprünglich aus einem anderen Grunde geweckt. Wir vermuteten, daß es sich bei dem blau fluoreszierenden Produkt der Farbreaktion von Amiloridhydrochlorid Ph. Eur. [5] um diese Substanz handelt. Amilorid [2] wird jedoch durch Hypobromit

zum 3-(3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-5-chlor-2,6-pyrazindiamin (**5**) [6] dehydriert (Schema 2).



1 **5**

Schema 2: Farbreaktion von Amilorid (**1**) nach Ph. Eur. [6]

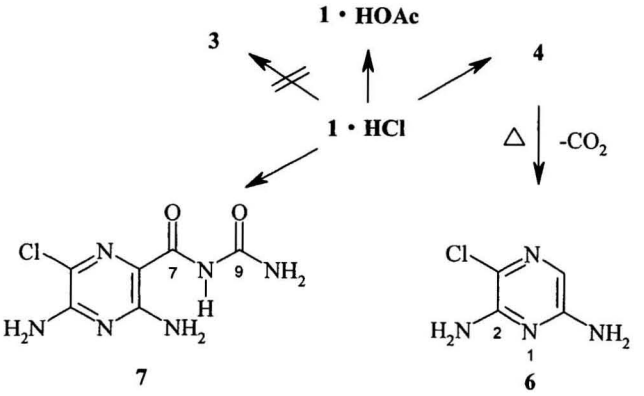
Wir haben nun die Untersuchungen zur Stabilität von Amiloridhydrochlorid im schwach saurem Milieu wiederholt, um das Pteridinon **3** in die Hand zu bekommen.

Ergebnisse und Diskussion

Amiloridhydrochlorid (**1 • HCl**) wurde in einem Acetatpuffer *p*H 4.6 unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen kristallisierte eine bräunliche Substanz aus, die bei der DC mit verschiedenen Eluenten das gleiche Fließverhalten wie das Edukt zeigte. Auch im EI-MS stimmte der Molpeak und das Fragmentierungsschema mit dem der Base Amilorid (**1**) überein. Wegen der Schwerlöslichkeit der Substanz ließ sich kein ^{1}H-NMR-Spektrum anfertigen. Im IR-Spektrum der Substanz konnten jedoch beim Vergleich mit dem von **1 • HCl** Unterschiede festgestellt werden. Die Elementaranalyse bewies, daß die Verbindung als Amiloridacetat (**1 • AcOH**) vorlag.

Das Filtrat zeigte das DC zwei Abbauprodukte, von denen sich die lipophilere Substanz mit Chloroform aus alkalischer Lösung abtrennen ließ. Es handelt

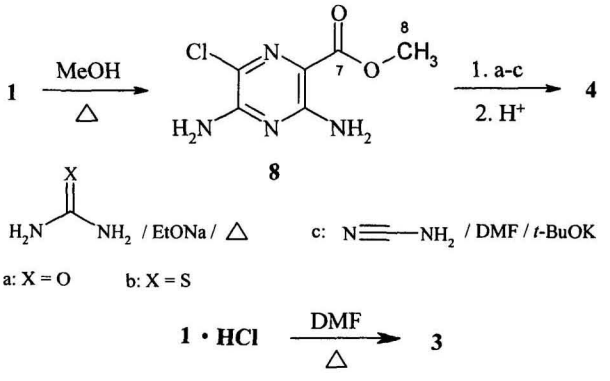
sich bei dieser Verbindung um das 3-Chlor-2,6-pyrazindiamin (**6**). Im ^{1}H-NMR-Spektrum werden drei Singuletts für das 3-H und die jeweils 2 Protonen der beiden Aminogruppen registriert. Im ^{13}C-NMR-Spektrum treten vier Signale für C-2, C-3, C-5 und C-6 auf. Ihre chemischen Verschiebungen entsprechen annähernd den Werten, die durch Inkrementrechnungen ausgehend von Pyrazin (δ = 145.3), unter Verwendung der Inkremente für substituierte Pyridine [7], berechnet wurden. Zudem sind die Werte für die quartären Kohlenstoffe C-2 und C-3 mit jenen von 3-Chlor-5-iod-2,6-pyrazindiamin [8] vergleichbar.



Schema 3: Abbauprodukte von Amiloridhydrochlorid (**1 · HCl**) im Acetatpuffer pH 4.6

Im EI-MS ist neben dem Molpeak nach Abspaltung von Cyanwasserstoff ein weiterer intensitätsstarker Peak für M^+-27 zu erkennen. Um von **1 • HCl** zum Pyrazin **6** zu gelangen, muß Hydrolyse zur 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonsäure (**4**) mit anschließender Decarboxylierung erfolgt sein (Schema 3).

Das hydrophilere Produkt wurde bei *p*H 6 mit *tert*-Butylmethylether ausgeschüttelt und als *N*-[(3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazinyl)carbonyl]harnstoff (**7**) identifiziert. Das Hydrolyse-produkt **7** ist literaturbekannt [9]. Das ^{1}H-NMR-Spektrum zeigt drei NH-Signale im Verhältnis von 1 : 1 : 5. Die ^{13}C-NMR-Daten stimmen mit berechneten Werten [10] bzw. mit denen von Amilorid (**1**) gut überein. Im EI-MS (M^+ bei 230/232) wird die Seitenkette unter Eliminierung von Ammoniak zum 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonyl-isocyanat (*m/z* 213/215) abgebaut. Andererseits wird unter Abspaltung von Isocyansäure das Fragment *m/z* 187/189 für 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarboxamid erhalten. Weitere Fragmentionen sind mit denen von Amilorid (**1**) identisch [6].



Schema 4: Versuche zur Synthese des Pteridinons **3**

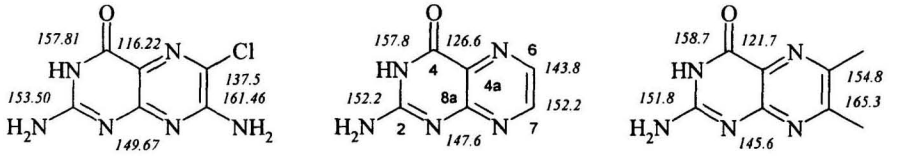
Zur gezielten Darstellung des Pteridinons **3** wurden Versuche zur thermischen Cyclisierung der Amilorid-Base (**1**) [2] vorgenommen:

a. trockenes Erhitzen in der Mikrowelle,
b. Erhitzen in *n*-Butanol, auch in Gegenwart von Kalium-*tert*-butanolat und
c. Erhitzen in Eisessig.

Stets wurde eine nicht trennbare Produktpalette erhalten.

Beim Erhitzen in Methanol wurde dagegen der Methylester **8** [2,11] rein isoliert. Um die Reaktivität des Esters zu prüfen, wurde sowohl mit Harnstoff /Natriumethanolat als auch mit Thioharnstoff/Natriumethanolat und Ethanol als Lösemittel erhitzt. Der gebildete gelbliche Niederschlag war wasserlöslich. Die nach Zugabe von Salzsäure ausgefällte Substanz erweis sich als 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonsäure (**4**) [4,11]. Nach Umsetzung des Esters **8** mit Cyanamid in Dimethylformamid (DMF) und Kalium-*tert*-butanolat als Katalysator konnte anstelle des Pteridinons **3** ebenfalls nur die Säure **4** isoliert werden (Schema 4).

Daraufhin wurde Amiloridhydrochlorid (**1** • **HCl**) in DMF unter Rückfluß erhitzt. Aus der heißen Lösung fiel eine gelbe Substanz aus, die im EI-MS den für das Pteridinon **3** geforderten Molpeak *m/z* 212/214 zeigte. Unter Abspaltung eines Carbodiimid-Radikals wird mit *m/z* 171/173 ein Pyrazincabonylium-Fragment gebildet. Wegen der Schwerlöslichkeit der Verbindung **3** konnte das ^{13}C-NMR-Spektrum nur in deuterierter Trifluoressigsäure (D-TFA) aufgenommen werden. Die Auswertung des Spektrums erfolgte durch Vergleich mit den Spektren von 2-Amino-4(3*H*)-pteridinon (**9**) und 2-Amino-6,7-dimethyl-4(3*H*)-pteridinon (**10**) [12], die ebenfalls in D-TFA vermessen wurden. Bei Pterinen erfolgt in TFA Protonierung an N-1 [13]. Das ^{13}C-NMR-Spektrum des Pteridinons **3** zeigt 6 quartäre Kohlenstoffatome und die gefundenen chemischen Verschiebungen für C-2, C-4 und C-8a stimmen gut mit den Verbindungen **9** und **10** überein.



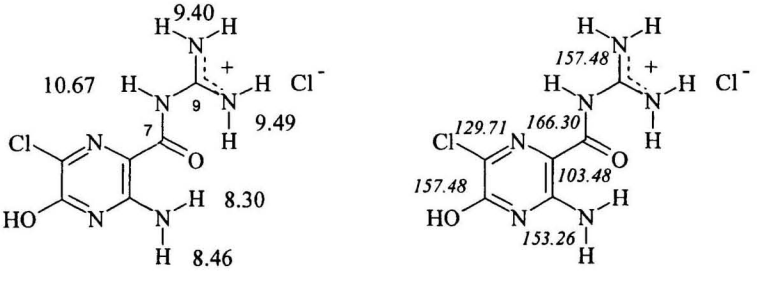
3 **9** **10**

Schema 5: ^{13}C-Verschiebungen (*kursiv*) von **3** und den Referenzsubstanzen **9** und **10**

Berechnet man die ungefähren chemischen Verschiebungen für C-4a, C-6, C-7 und C-8a von **3**, ausgehend von den korrespondierenden Werten beim Vergleichskörper **9** unter Verwendung der Inkremente für Cl und NH_2 bei Pyridin [7], so zeigt sich, daß auch diese Werte (116.6; 130.4; 164.2; 145.5) gut mit den bei **3** gefundenen übereinstimmen (vgl. Schema 5).

Der endgültige Strukturbeweis für **3** durch Röntgenkristallanalyse schlug fehl, da der aus DMSO gewonnene Einkristall sich als nicht messbarer Zwilling herausstellte.

Wurde Amiloridhydrochlorid (**1 • HCl**) in Salzsäure (1 mol/l) (pH 0) unter Rückfluß erhitzt, so fiel nach einigen Stunden aus der siedenen Lösung eine gelbliche kristalline Substanz aus, die als Hydrochlorid des 5-Hydroxypyrazin-Derivats **2** identifiziert wurde. **2 • HCl** dürfte wie **1 • HCl** in der Acylamino-Struktur vorliegen. Das ^{1}H-NMR-Spektrum in [D_{18}]HMPT zeigt fünf Singuletts für die NH-Protonen, während das Resonanzsignal des sauren Protons der Hydroxyl-Gruppe (pk_a = 5.45 [13]) im Rauschpegel verschwindet. Die Signalzuordnung im ^{13}C-NMR-Spektrum wurde durch Vergleich mit den ^{13}C-NMR-Daten von Amiloridhydrochlorid (**1 • HCl**) [6] vorgenommen. Die Signale für C-5 und C-9 zeigen die gleiche chemische Verschiebung (Schema 6).



Schema 6: ^{1}H- und ^{13}C (*kursiv*)-Verschiebungen von **2 · HCl**

Das EI-MS von **2 • HCl** zeigt neben dem Molpeak von *m/z* 230/232 für die Base ein dem **1 • HCl** entsprechendes Fragmentierungsschema [6], deren Peaks aufgrund des Austausches der 5-Amino- gegen die 5-Hydroxyl-Gruppe um jeweils eine Masseneinheit größer sind.
Mehrstündiges Erhitzen von **1 • HCl** in Natronlauge (*p*H 13.5) ergab nach Ansäuern die Carbonsäure **4**, wie die spektroskopischen Daten [2] zeigten.

Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben und Geräte: [6]. * *bedeutet: Zuordnung nicht gesichert.*

***N-[(3-Amino-6-chlor-5-hydroxy-2-pyrazinyl)carbonyl]guanidinhydrochlorid* (2 · HCl)**

0,3 g (1 mmol) **1** · **HCl**-Dihydrat werden in 50 ml 1 mol/l HCl 24 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag abfiltriert, mit EtOH und Et_2O gewaschen. Ausbeute: 230 mg (87%). Gelbes Pulver, Fp. > 350 °C, > 300 °C [3]. ^{1}H-NMR ([D_{18}]HMPT): δ (ppm) = 10. 67 (s, NH), 9.49 (s, 2H), 9.40 (s, 2H), 8.46 (s, 1H), 8,30 (s, 1H). ^{13}C-NMR ([D_{18}]HMPT): δ (ppm) = 103.48 (C-2), 129.71 (C-6), 153.26 (C-3), 157.48 (C-5, C-9), 166.3 (C-7). MS (EI): m/z (%) = 230 (25) $[M]^{+\bullet}$, 213 (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3438 cm^{-1}, 3398, 3307, 3041 (OH, NH), 1676 (C=O), 1621, (C=N, C=C). CHN für $C_6H_7ClN_6O_2$ · HCl (267.1). Ber: C 26.98 H 3.02 N 31.47; Gef: C 26.96 H 2.92 N 31.01.

2,7-Diamino-6-chlor-4(3H)-pteridinon (3)

0,3 g (1 mmol) **1** · **HCl**-Dihydrat werden in 20 ml DMF 8 h unter Rückfluß erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit DMF, H_2O und MeOH gewaschen. Ausbeute: 40 mg (19%). Gelbes Pulver, Fp. > 350 °C. ^{1}H-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 6.64 (s, 2H, NH_2), 7.40 (s, 2H, NH_2), 10.89 (s, 1H,

NH). ^{13}C-NMR (D-TFA): δ (ppm) = 116.22 (C-4a), 137.20 (C-6), 149.67 (C-8a), 153.50 (C-2), 157.81 (C-4), 161.46 (C-7). MS (EI): m/z (%) = 212 (100) $[M]^{+\bullet}$. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3412 cm^{-1} (NH), 3359, 3150 (NH_2), 1690 (C=O), 1618 (C=N, C=C). HPLC (MeCN/H_2O 20:80): t_s = 0.03 min. CHN für $C_6H_5ClN_6O$ (212.6). Ber: C 33.90 H 2.37 N 39.53; Gef: C 33.03 H 2.30 N 35.91.

N"[(3,5-diamino-6-chlor-2-pyrazinyl)carbonyl]guanidin acetat (1 · HOAc)

0,91 g (3 mmol) **1 · HCl**-Dihydrat werden in 120 ml H_2O und 30 ml AcOH/AcONa-Puffer *p*H 4,6 unter Rückfluß 24 h erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag abgesaugt. Ausbeute: 160 mg (18%). Braune Kristalle, Fp. ab 240 °C (Zers.). MS (EI): m/z (%) = 229 (100) $[M]^{+\bullet}$, 212 (20). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3400 cm^{-1} , 3337, 3060 (NH), 1708 (C=O), 1667, 1620 (C=N, C=C). CHN für $C_6H_8ClN_7O \cdot CH_3COOH$ (289.6). Ber: C 33.17 H 4.18 N 33.85; Gef: C 33.08 H 4.17 N 33.61.

3-Chlor-2,6-pyrazindiamin (6)

Das Filtrat von **1 · HOAc** wird mit Natronlauge alkalisiert und 3 x mit 70 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. abgezogen. Ausbeute: 30 mg (7%). Gelbe Nadeln, Fp. 170 °C (Toluol). ^{1}H-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 6.86 (s, 5-H), 6.07 (s, NH_2), 5.98 (s, NH_2). ^{13}C-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 116.74 (C-5), 117.29 (C-3), 150.21 (C-6), 154.23 (C-2). MS (EI): m/z (%) = 144 (100) $[M]^{+\bullet}$, 117 (50). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3467 cm^{-1}, 3308, 3154 (NH), 1644, 1614 (C=N, C=C). CHN für $C_4H_5ClN_4$ (144.5). Ber: C 33.23 H 3.48 N 38.76; Gef: C 33.77 H 3.38 N 37.57.

***N-[(3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazinyl)carbonyl]harnstoff* (7)**

Die verbleibende wässrige Phase von Substanz **6** wird auf *p*H 6 eingestellt und 3 x mit *tert*-BuOMe ausgeschüttelt. Nach Trocknen über

Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Ausbeute: 14 mg (2%), Fp. 260 °C (MeOH) [9]. ^{1}H-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 8.84 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.33 (s, 5H). ^{13}C-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 109.67 (C-2), 118.68 (C-6), 152.95 * (C-3), 153.93 * (C-5), 155.37 * (C-9), 164.92 (C-7). MS (EI): m/z (%) = 230 (30) $[M]^{+\bullet}$, 213 (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3466 cm^{-1}, 3328, 3153 (NH), 1727, 1671 (C=O), 1637, 1617 (C=N, C=C).

***Methyl-3,5-diamino-6-chlor-2-pyrazincarboxylat* (8)**

0,23 g (1 mmol) **1** werden in einer Mischung aus 25 ml $CHCl_3$ und 25 ml MeOH 17 h unter Rückfluß erhitzt. Es wird mit 50 ml Wasser und anschließend 4 x mit 50 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. abdestilliert. Ausbeute: 120 mg (60%). Gelbe Nadeln, Fp. 207 °C (MeOH), 212-213 °C (MeCN) [2]. ^{1}H-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 3.73 (s, CH_3), 7.10 (s, 2H), 7.20 (s, 2H). ^{13}C-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 51.1 (C-8), 109.4 (C-2), 119.2 (C-6), 153.2 * (C-5), 155.8 * (C-3), 165.8 (C-7). MS (EI): m/z (%) = 202 (100) $[M]^{+\bullet}$, 144 (75). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3477 cm^{-1}, 3449, 3355, 3150 (N-H), 1669 (C=O),. 1644, 1605 (C=N, C=C). UV (Dioxan): λ_{max} (lg ε) = 269 nm (4.19), 351 (4.16). Fluoreszenz (Dioxan/Anregungswellenlänge 270 nm): λ_{max} = 400 nm. CHN für $C_6H_7ClN_4O_2$ (202.6). Ber: C 35.57 H 3.48 N 27.65; Gef: C 35.60 H 3.45 N 27.47.

***3,5- Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonsäure* (4)**

0,23 g (1 mmol) **1** wird in 50 ml H_2O suspendiert. Es wird mit 4 mol/l NaOH auf *p*H 13,5 eingestellt und 7h bei 90 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird angesäuert, der Niederschlag abgesaugt und mit H_2O, wenig EtOH abs. und Et_2O gewaschen. Ausbeute: 110 mg (57%). Hellgelbes Pulver, Fp. 225

°C (DMSO/H_2O), 230-231 °C, 272 °C (DMSO/H_2O) [4]. ^{1}H-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 12.13 (s, OH), 7.21 (s, 4H). ^{13}C-NMR ([D_6]DMSO): δ (ppm) = 110.1(C-2), 118.7 (C-6), 153.2 * (C-5), 155.9 * (C-3), 167.3 (C-7). MS (EI): m/z (%) = 188 (100) $[M]^{+\bullet}$, 144 (80). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3619 cm^{-1}, 3415, 3317, 3167 (OH, NH_2), 1664 (C=O), 1618, 1559 (C=N, C=C). UV (Dioxan): λ_{max} (lg ε) = 269 nm (4.11), 352 (4.08). CHN für $C_5H_5ClN_4O_2$ (188.6). Ber: C 31.85 H 2.67 N 29.71; Gef: C 31.93 H 2.80 N 29.46.

Literatur

[1] Mazzo D J in Florey K, editor.
Analytical Profiles of Drug Substances,
Volume 15, Academic. Press, New York, 1986: 1-34.

[2] Smith R L, Cochran D W, Gund P, Cragoe, Jr. E J.
Proton, Carbon-13, and Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance and CNDO/2 Studies on the Tautomerism and Conformation of Amiloride, a Novel Acylguanidine.
J. Am. Chem. Soc. 1979; 101: 191-201.

[3] Cragoe, Jr. E J, Woltersdorf, Jr. O W, Bicking J B, Kwong S F, Jones J H.
Pyrazine Diuretics. II., N-Amidino-3-amino-5-substituted 6-Halopyrazinecarboxamides.
J. Med. Chem. 1967; 10: 66-75.

[4] Shepard K L, Mason J W, Woltersdorf, Jr. O W, Jones J H, Cragoe, Jr. E J.
Pyrazine Diuretics. VI. (Pyrazinecarboxamido)Guanidines.
J. Med. Chem. 1969; 12: 280-285.

[5] Europäisches Arzneibuch 2002. 4th ed.

Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, 2002: 1169.

[6] Görlitzer K, Huth S, Jones P G, Gößnitzer E, Wendelin W. Zur Farbreaktion von Amiloridhydrochlorid Ph. Eur. Sci. Pharm. 2001; 69: 275-287.

[7] Kalinowski H-O, Berger S, Braun S. ^{13}C NMR Spektroskopie. Georg Thieme: Stuttgart, 1984.

[8] Chapdelaine M J, Warwick P J, Shaw A. An Efficient Method for Preparation of 3,5-Diamino-6-chlorpyrazin-2-yl Alkylketones Using a Novel Acetylene Hydrattion Method. J. Org. Chem. 1989; 54: 1218-1221.

[9] Hanifin J W, Capuzzi R, Cohen E. The Preparation of Substituted N-Carbamoylpyrazinecarboxamides. J. Med. Chem. 1969; 12: 1102-1103.

[10] ACD/CNMR Predictor, Release 7.00, Product Version 7.07

[11] Tobias S, Günther H, Pfleiderer W. Pteridin-Spektren IV. Chem. Ber. 1985; 118: 354-362.

[12] Ewers U, Günther H, Jaenicke L. Pteridin-Spektren III. Chem. Ber. 1974; 107: 3275-3286.

[13] Bock M G, Schlegel H B, Smith G M. Theoretical Estimation of pKa Values of Pyrazinylguanidine Derivatives. J. Org. Chem. 1981; 46: 1925-1927.

Eingelangt am 20. April 2004
Angenommen am 17. Mai 2004