

## Zur Farbreaktion von Amiloridhydrochlorid Ph. Eur.<sup>+</sup>

Klaus Görlitzer<sup>1\*</sup>, Silke Huth<sup>1</sup>, Peter G. Jones<sup>2</sup>,  
Edith Gößnitzer<sup>3</sup> und Winfried Wendelin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig,  
Beethovenstraße 55, D-38106 Braunschweig,

<sup>2</sup> Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Technischen Universität Braunschweig,  
Hagenring 30, D-38106 Braunschweig,

<sup>3</sup> Institut für Pharmazeutische Chemie und Pharmazeutische Technologie der Karl-Franzens-  
Universität Graz, Schubertstraße 1, A-8010 Graz

### *The Colour Reaction of Amiloride Hydrochloride Ph. Eur.*

The reaction of amiloride hydrochloride (1.HCl) with bromine in alkaline solution generated a yellow-brown dehydrogenation product, which turned out as 3-(3-amino-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-5-chloro-2,6-pyrazinediamine (**2**). The structure was deduced from the MS and the NMR spectra of **2** with the help of comparisons with corresponding spectra of amiloride (**1**) and reference substances **3** - **5**. The agreement of all relevant data of the product and of authentic oxadiazolyipyrazine **2** as well as the accomplished X-ray analysis confirmed the postulated structure. The mechanism of the formation of **2** is also discussed.

(Keywords: Amiloride, colour reaction with bromine; 2,6-Pyrazinediamine, 3-(3-amino-1,2,4-oxadiazol-5-yl), 5-chloro; X-ray analysis; MS analysis; and NMR analysis)

### Einleitung

Die Pharmacopoea Europaea<sup>1</sup> lässt zur Prüfung des diuretisch wirksamen Amiloridhydrochlorids (1.HCl, Darstellung und spektroskopische Daten siehe<sup>2-4</sup>) auf Identität neben physikalisch-chemischen Methoden auch eine Farbreaktion durchführen. Dazu wird 1.HCl mit Cetrimid (Cetyltrimethylammoniumchlorid)-Lösung, Natronlauge und Bromwasser bei Raumtemperatur umgesetzt. Die grünlichgelbe Färbung der erhaltenen Lösung schlägt auf Zusatz von Salzsäure nach Dunkelgelb um. Dies ist mit einer starken blauen Fluoreszenz verbunden, die durch ultraviolettes Licht der Wellenlänge von 365 nm angeregt wird.

---

<sup>+</sup> Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. W. Fleischhacker mit den besten Wünschen zum 70. Geburtstag gewidmet.

Die Struktur des für die Farbreaktion verantwortlichen Produkts war bislang unbekannt. Weder in der Monographie in Florey<sup>3</sup> noch im Kommentar zur Pharmacopoea Europaea<sup>5</sup> finden sich Hinweise auf die chemischen Vorgänge bei dieser Identitätsprüfung.

### Ergebnisse und Diskussion

Verfährt man nach der Vorschrift der Pharmacopoea Europaea<sup>1</sup>, verzichtet jedoch auf den für die Farbreaktion nicht notwendigen Zusatz von Cetrimid und extrahiert anschließend bei pH 3.2 mit *tert*-Butylmethylether, so erhält man nach Abdestillieren des Lösungsmittels und Waschen des Rückstandes mit Chloroform einen braunen Feststoff, der beim Umkristallisieren aus Dimethylformamid/Wasser gelbbraune Kristalle liefert. Die Ausbeute beträgt allerdings nur 1 %.

#### *Ableitung der Struktur des Farbprodukts 2 durch Vergleich des Massenspektrums mit jenem von Amilorid (1)*

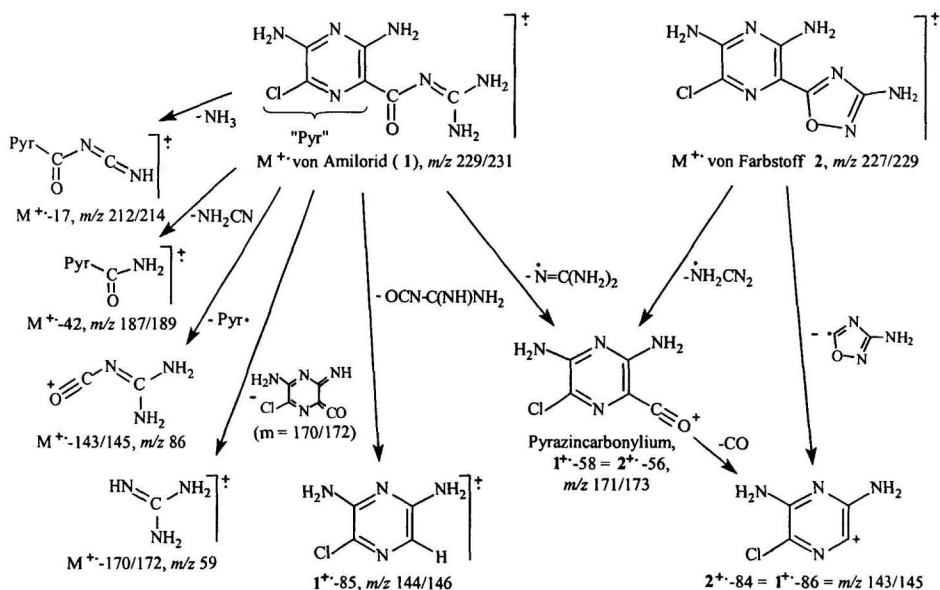
Im Massenspektrum wird der Molekülpeak des Farbprodukts bei einer um  $m/z = 2$  geringeren Masse gegenüber dem Edukt Amilorid (1) gefunden. Die Substanz enthält aufgrund des Isotopenmusters weiterhin ein Chloratom. Aus dem Massenspektrum und der Elementaranalyse ergibt sich die Summenformel  $C_6H_6ClN_7O$ , die Verbindung ist demnach ein Dehydrierungsprodukt von Amilorid.

Wichtige Hinweise auf die Struktur des Farbprodukts ergeben sich aus dem Vergleich des MS mit jenem von Amilorid (1) (Schema 1). Im MS von **1** erscheint der Molekülpeak ( $m/z$  229/231) als Base Peak. Außerdem findet man charakteristische Peaks mit der Masse  $M^+ - 17$ ,  $M^+ - 42$ ,  $M^+ - 58$  (Pyrazincarbonylium,  $m/z$  171/173, R.I. 34),  $M^+ - 59$  ( $m/z$  171/173, nicht im Schema),  $M^+ - 85$  (Pyrazin-Kationen,  $m/z$  144/146, R.I. 50), und  $M^+ - 86$  (Pyrazinyl-Kationen,  $m/z$  143/145, R.I. 20). Die genannten Peaks entstehen durch Eliminierung von Ammoniak bzw. Cyanamid, Diaminomethylenaminyl-, Guanidin, Carbonylguanidin bzw. Amidinoisocyanat, sowie Guanidincarbonyl-Radikale, und dokumentieren den schrittweisen Abbau der Guanidino- bzw. (Diaminomethylenamino)carbonyl-Seitenkette. Komplementär findet man auch intensitätsstarke Peaks für Cyanamid-, Guanidin- und Guanidincarbonyl-Kationen bei  $m/z$  43 (nicht im Schema), 59 und 86.

Aus dem Molekülion des Farbstoffs **2** ( $m/z$  227/229, Base Peak) hingegen entstehen nur zwei wichtige Fragmentationen, nämlich Pyrazincarbonyl- ( $M^+ - 56$ ,  $m/z$  171/173, R.I. 56) und Pyrazinyl-Kationen, ( $M^+ - 84$ ,  $m/z$  143/145, R.I. 50), die auch im MS von Amilorid (1) gefunden werden. Sie bilden sich beim Farbstoff **2** durch Abspaltung des vergleichsweise

wasserstoffarmen Radikals  $\text{H}_2\text{NCN}_2^{\cdot}$  (oder  $\text{HCN}$ ,  $\text{N}_2$  und  $\text{H}$ ) bzw. von Aminooxadiazolyl-Radikalen. Die Diaminochlorpyrazinteilstruktur bleibt bei der Fragmentierung sowohl des Farbstoffs als auch von **1** weitgehend unberührt (Peaks mit jeweils nur geringer Intensität durch Abspaltung von  $\text{HCN}$  aus den Molekülonen sowie den Fragmentionen  $\text{M}^{+}$ -56 und  $\text{M}^{+}$ -84).

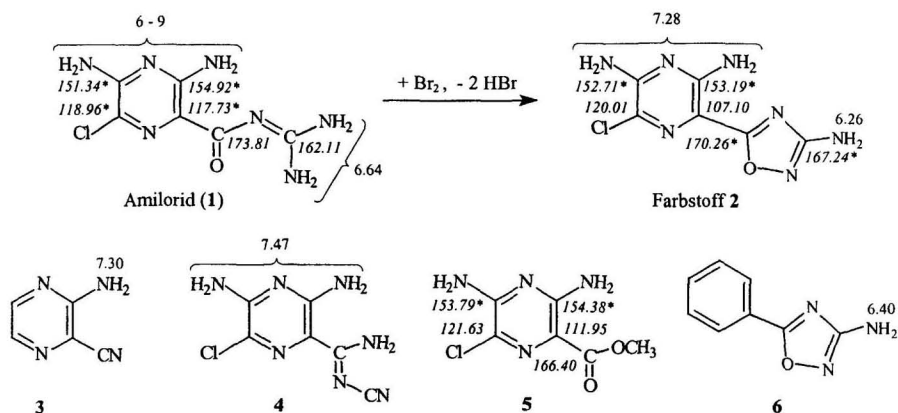
Die genannten Befunde zeigen, daß das Farbprodukt aus Amilorid (**1**) durch Dehydrierung der Guanidincarbonyl-Teilstruktur ohne Beteiligung des Diaminochlorpyrazinteiles entstanden ist. Da eine Dehydrierung des Guanidincarbonyl-Restes nur unter gleichzeitigem Ringschluß möglich ist, folgt, daß das Produkt sehr wahrscheinlich als 3-(3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-5-chlor-2,6-pyrazindiamin (**2**) vorliegt (Schema 1). Das Vorhandensein des kompakten aromatischen Aminooxadiazolylrestes in **2** an Stelle des leicht fragmentierbaren Guanidincarbonylrestes in **1** erklärt auch sehr gut die im Vergleich zu **1** höhere Stabilität des Farbprodukts **2** im MS.



**Schema 1.** Fragmentierungsreaktionen von Amilorid (**1**) und Farbstoff **2**

*Ableitung der Struktur des Farbstoffes 2 aus den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren anhand von Vergleichen mit Referenzsubstanzen*

Das FT-IR-Spektrum zeigt fünf separierte NH-Valenzschwingungen, das <sup>1</sup>H-NMR in [D<sub>6</sub>]DMSO hingegen nur zwei Signale für Aminprotonen mit den Intensitäten 4 und 2 bei  $\delta = 7.28$  und 6.26. Die chemische Verschiebung der Protonen zweier chemisch äquivalenter Aminogruppen von  $\delta = 7.28$  ist typisch für 3/5-Aminopyrazin-2-carbonsäure-Derivate wie z. B. 3-Amino-2-pyrazincarbonitril (**3**) ( $\delta = 7.30$ )<sup>6</sup> oder 3,5-Diamino-5-chlorpyrazin-2-(*N*-cyanocarboxamidin) (**4**) ( $\delta = 7.47$ )<sup>7</sup>, was auf das Vorhandensein einer kaum veränderten Pyrazindiamin-Teilstruktur im Reaktionsprodukt hindeutet. Die Protonen der dritten Aminogruppe treten bei  $\delta = 6.26$  in Resonanz, einem Bereich, der bei Oxadiazolaminen, z. B. 5-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-amin (**6**) ( $\delta = 6.40$ )<sup>8</sup>, beobachtet wird (Schema 2). Der Vergleich der <sup>13</sup>C-Spektren von Amilorid **1** und Produkt **2** bestätigt diese Befunde, die Spektren unterscheiden sich lediglich bei den chemischen Verschiebungen der C-Atome in der Guanidin-carbonyl- bzw. Oxadiazol-Teilstruktur sowie beim Carbonyl-substituierten C-2 von **1** bzw. dem korrespondierenden Oxadiazol-substituierten C-3 des Farbstoffs deutlich.



**Schema 2.** <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C (*kursiv*)-Verschiebungen ( $\delta$ -Werte in ppm) von **1**<sup>3,4</sup>, **2** und Vergleichssubstanzen **3** - **6**<sup>6-9</sup> (alle in [D<sub>6</sub>]DMSO, die Zuordnung bei mit \* markierten Werten ist nicht gesichert)

Die chemischen Verschiebungen der Pyrazinkohlenstoffe C-2,6 ( $\delta = 153.19/152.71$ ) und C-5 ( $\delta = 120.01$ ) von Farbstoff **2** stimmen weitgehend mit denen der Signale für die korrespondierenden C-3,5 und C-6 bei **1** ( $\delta = 154.92/151.34$ ; 118.96) bzw. Aminopyrazin-carbonsäureester **5** ( $\delta = 154.38/153.79$ ; 121.63)<sup>9</sup> überein (siehe Schema 2).

Diese Befunde zeigen, ebenso wie die MS-Vergleiche, daß die Reaktion von **1** mit Brom unter Dehydrierung lediglich des Guanidincarbonylrestes erfolgt war und der Farbstoff als (Aminooxadiazolyl)chlorpyrazindiamin **2** vorliegt.

Zur Sicherung der Struktur von **2** wurden eine Röntgenstrukturanalyse und 2D-NMR-Untersuchungen durchgeführt. Parallel dazu wurde in der Literatur geprüft, ob Verbindung **2** bereits bekannt ist.

#### *Röntgenstrukturanalyse von 2*

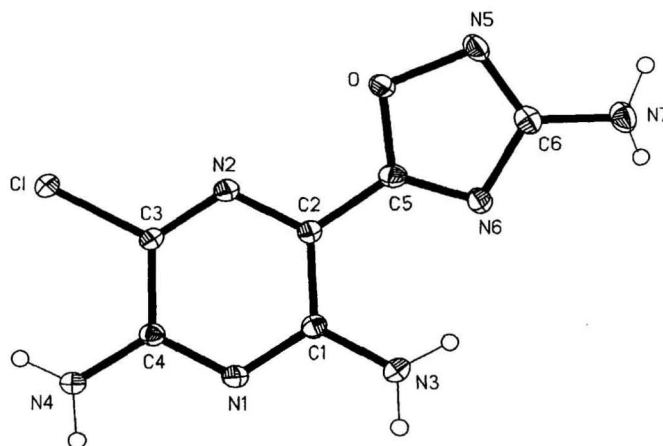
Zur Durchführung wurden Einkristalle gezüchtet und eine Röntgenkristallstrukturanalyse durchgeführt, die bewies, dass eine Dehydrierung des Acylguanidins von **1** zum 3-Amino-1,2,4-oxadiazol **2** erfolgt war (Abb. 1). Wie die Torsionswinkel zeigen, liegen der Pyrazin- und der Oxadiazol-Ring praktisch in einer Ebene. Die nahezu planare Fixierung durch Wasserstoffbrückenbindung (der Abstand N(3)-H...N(6) beträgt 2.18 Å) zwischen der 2-Aminogruppe des Pyrazins und dem N-4 des 1,2,4-Oxadiazols dürfte für die intensive blaue Fluoreszenz des Farbprodukts in Lösung verantwortlich sein.

#### *Literaturrecherche*

Farbstoff **2** ist bekannt und bereits auf zwei alternativen, jeweils eindeutigen Wegen<sup>7,10</sup> synthetisiert worden, z. B. von Watthey et al.<sup>7</sup> durch Addition von Hydroxylamin an das Pyrazin-2-(N-cyancarboxamidin) **4** (Schema 2) und Ringschluß zu **2**. Der Vergleich der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Verschiebungen im NMR sowie der IR-Banden des von uns isolierten Farbstoffs mit den Daten des von Bock et al.<sup>10</sup> hergestellten Oxadiazolylpyrazindiamins **2** ergab eine gute Übereinstimmung. Verbindung **2** ist als Prodrug von Amilorid (**1**) anzusehen, da aus der Substanz **2** in Tiermodellen *in vivo* durch reduktive Ringöffnung **1** gebildet wird<sup>10</sup>. Synthesen von Oxadiazolaminen des Typs **2** durch Dehydrierung von Acylguanidinen, wie hier bei der Reaktion von **1** mit Brom und Natronlauge beobachtet, sind ebenfalls beschrieben worden. Z. B. läßt sich das als Vergleichssubstanz erwähnte 5-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-2-amin (**6**) durch Behandlung von Benzoylguanidin mit Natriumhypochlorit herstellen<sup>11</sup>.

#### *2D-NMR-Untersuchungen von 2*

Wie oben gezeigt, erlaubten die Vergleiche der <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren des isolierten Produkts **2** mit den Spektren von Amilorid (**1**) und den Referenzsubstanzen **3** - **6** die Ableitung der Struktur des Aminooxadiazolylpyrazindiamins **2**. Offen blieb allerdings die Frage



#### Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	$C_6H_6ClN_7O$	
$M_r$	227.63	
Temperatur	133(2) K	
Wellenlänge	0.71073 Å	
Kristallsystem	monoklin	
Raumgruppe	$P2_1/c$	
Gitterkonstanten	$a = 5.8398(4)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 10.8565(8)$ Å	$\beta = 95.753(3)^\circ$
	$c = 13.4422(11)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen, Z	$847.94(11)$ Å <sup>3</sup> , 4	
Dichte (berechnet)	1.783 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorptionskoeffizient	0.434 mm <sup>-1</sup>	
F (000)	464	
Kristallgröße	0.43 x 0.23 x 0.10 mm <sup>3</sup>	
$\theta$ -Bereich für die Datensammlung	1.45 bis 30.02°	
Limitierende Indizes	$-8 \leq h \leq 8, -14 \leq k \leq 15, -18 \leq l \leq 18$	
Zahl der Reflexe	15690	
Unabhängige Reflexe	2477 [R(int) = 0.0350]	
Vollständigkeit bis $\theta = 30^\circ$	99.6%	
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Daten/Einschränkungen/Parameter	2477/15/160	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.096	
Final R-Indizes [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.0283, wR2 = 0.0780	
R-Indizes (alle Daten)	R1 = 0.0319, wR2 = 0.0805	
Größte Differenzpeaks (Maximum und Minimum)	0.598 und -0.200 e.Å <sup>-3</sup>	

**Abb.1** Röntgenstrukturanalyse des 3-(3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-5-chlor-2,6-pyrazindiamins (2).  
Ellipsoide entsprechen 50%iger Aufenthaltswahrscheinlichkeit.

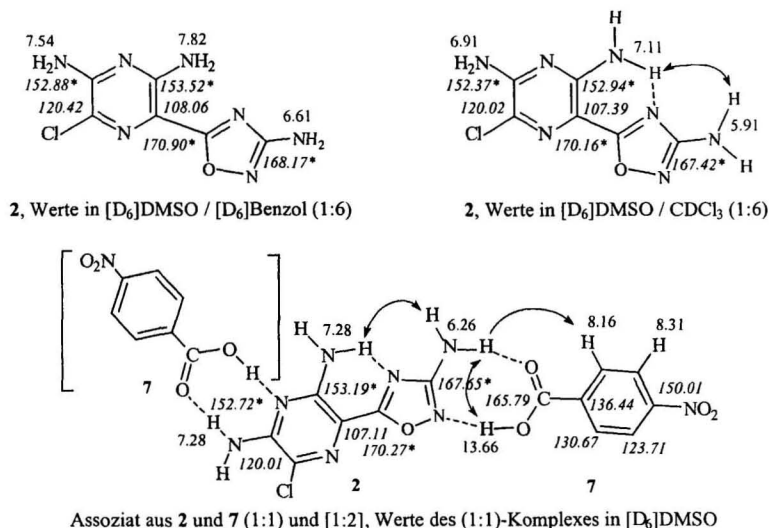
der korrekten Zuordnung der jeweils paarweise nahe beieinander liegenden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale bei  $\delta = 153.19/152.71$  zu C-2 bzw. C-6 und bei  $\delta = 107.10/120.01$  zu C-3 bzw. C-5 im Pyrazin-, sowie der Signale bei  $\delta = 167.24/170.26$  zu C-3' bzw. C-5' im Oxadiazolring. Vergleiche mit Amilorid (**1**), dessen  $^{13}\text{C}$ -Signale Smith et al.<sup>4</sup> auf Grund sorgfältiger Studien mit modifizierten Modellsubstanzen des Typs **1** (H, Br, J anstelle von Cl; Dimethylamino anstelle von  $\text{NH}_2$ , etc.), jedoch ohne Absicherung durch Korrelationsspektren zugeordnet hatten, und mit 6-Chlor-3,5-diaminopyrazin-2-carbonsäuremethylester (**5**)<sup>9</sup> (siehe Schema 2) sprachen für die Zuordnung der Signale von **2** bei  $\delta = 107.10$  und  $120.01$  zu C-3 und C-5. Sie erlaubten jedoch nicht die sichere Zuordnung der beiden anderen Signalaare.

Es wurde deshalb versucht, die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Signale von **2** über die Messung von CH-Korrelationen zwischen den zwei Sorten von Aminprotonen in 2,6-Stellung des Pyrazinringes ( $\delta = 7.28$ ,  $I = 4$ ) bzw. in 3-Stellung des Oxadiazolringes ( $\delta = 6.26$ ,  $I = 2$ ) und Kohlenstoff der beiden Ringe über zwei, drei und vier Bindungen durchzuführen. Zugleich sollte durch Auffinden überlappender Korrelationen im Bereich von C-3 und C-5' die Verknüpfung von Pyrazin- und Oxadiazolring spektroskopisch nachgewiesen werden.

Die zunächst in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  durchgeführten HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) Experimente zeigten jedoch nur Korrelationen zwischen den Aminprotonen bei  $\delta = 7.28$  und den Kohlenstoffatomen des Pyrazinringes bei  $\delta = 107.10$  und  $152.71$ , was für die beabsichtigte detaillierte Strukturanalyse nicht genügte.

Um eine Nichtäquivalenz der Amingruppen am Pyrazin herbeizuführen und zusätzliche CH-Korrelationen zu finden, wurden auch Messungen in Lösungsmittelgemischen (ein kleiner Anteil an  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  war wegen der sehr schlechten Löslichkeit von **2** in lipophilen Lösungsmitteln immer notwendig) und in Gegenwart von Säuren durchgeführt.

Die Verwendung von  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ - $[\text{D}_6]\text{Benzol}$  (1:6) als Lösungsmittel führte bei den Signalen für die Aminprotonen des Pyrazin-2,6-diamins bzw. 3'-Aminooxadiazolylrestes von **2** zu Tieffeldverschiebungen von 0.54 und 0.26 bzw. 0.35 ppm, sodaß nun für die Aminogruppen des Pyrazindiamins zwei getrennte Resonanzen bei  $\delta = 7.82$  und  $7.54$  auftraten (Schema 3). Allerdings waren die beiden Signale durch chemischen Austausch stark verbreitert, sodaß keine erfolgreichen 2D-Messungen möglich waren. Die Anwendung von  $[\text{D}_6]\text{DMSO-CDCl}_3$  (1:6) hingegen führte bei den genannten Aminprotonen zu Hochfeldverschiebungen der Signale von  $-0.17$  und  $-0.37$  bzw.  $-0.35$  ppm bei nur mäßiger Verbreiterung. Wechselseitige NOEs zwischen den Oxadiazolamin-Protonen bei  $\delta = 5.91$  und den Aminprotonen bei  $\delta = 7.11$  ermöglichten die Zuordnung des letztgenannten Signals zu den  $\text{NH}_2$ -Protonen in Position 2 des Pyrazindiamins (Schema 3). CH-Korrelationen waren aber auch in diesem Falle nicht zu beobachten.



**Schema 3.**  $^1H$ - und  $^{13}C$  (*kursiv*)-Verschiebungen ( $\delta$ -Werte in ppm) sowie NOEs (symbolisiert durch Pfeile) von 2 in verschiedenen Lösungsmitteln und von Assoziaten aus 2 und 7 in  $[D_6]DMSO$ . Die Zuordnung von mit \* bezeichneten Werten ist nicht gesichert.

In drei weiteren Experimenten wurde geprüft, welche Auswirkungen auf Lage und Form der  $NH_2$ -Signale die Zugabe von Säuren hat, die Wasserstoffbrücken bilden.

Die  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR wie auch die CH-Korrelationsspektren der (1:1)- und (1:2)-Mischung von 2 und *p*-Nitrobenzoesäure (7) in  $[D_6]DMSO$  waren fast identisch mit den durch Superposition der Einzelspektren beider Verbindungen herstellbaren; 2 bildete also mit 7 kein Salz. Wechselseitige NOEs zwischen den Oxadiazolamin-Protonen bei  $\delta = 6.26$  und den sauren Protonen von 7 bei  $\delta = 13.66$  deuten im (1:1)-Gemisch auf die Bildung von Assoziaten aus 2 und 7 hin, die, wie in Schema 3 skizziert, über Wasserstoffbrücken verbunden sein dürften. Übereinstimmend damit führt die Einstrahlung auf das Signal bei  $\delta = 6.26$  zur Anregung der *o*-Protonen von 7 bei  $\delta = 8.16$ , und zudem, wie bei Base 2, der Aminprotonen in 2-Stellung des Pyrazins bei  $\delta = 7.28$ . Ebenfalls wie bei 2 findet man CH-Korrelationen zwischen den Pyrazinamin-Protonen und C-3 ( $\delta = 107.11$ ) sowie C-2 bzw. C-6 ( $\delta = 152.72$ ). Eine schwache Korrelation zwischen den Oxadiazolaminprotonen bei  $\delta = 6.26$  und dem C-Signal bei  $\delta = 170.27$  zeigt, daß dieses Signal C-3' oder C-5' im Oxadiazolring zuzuordnen ist.



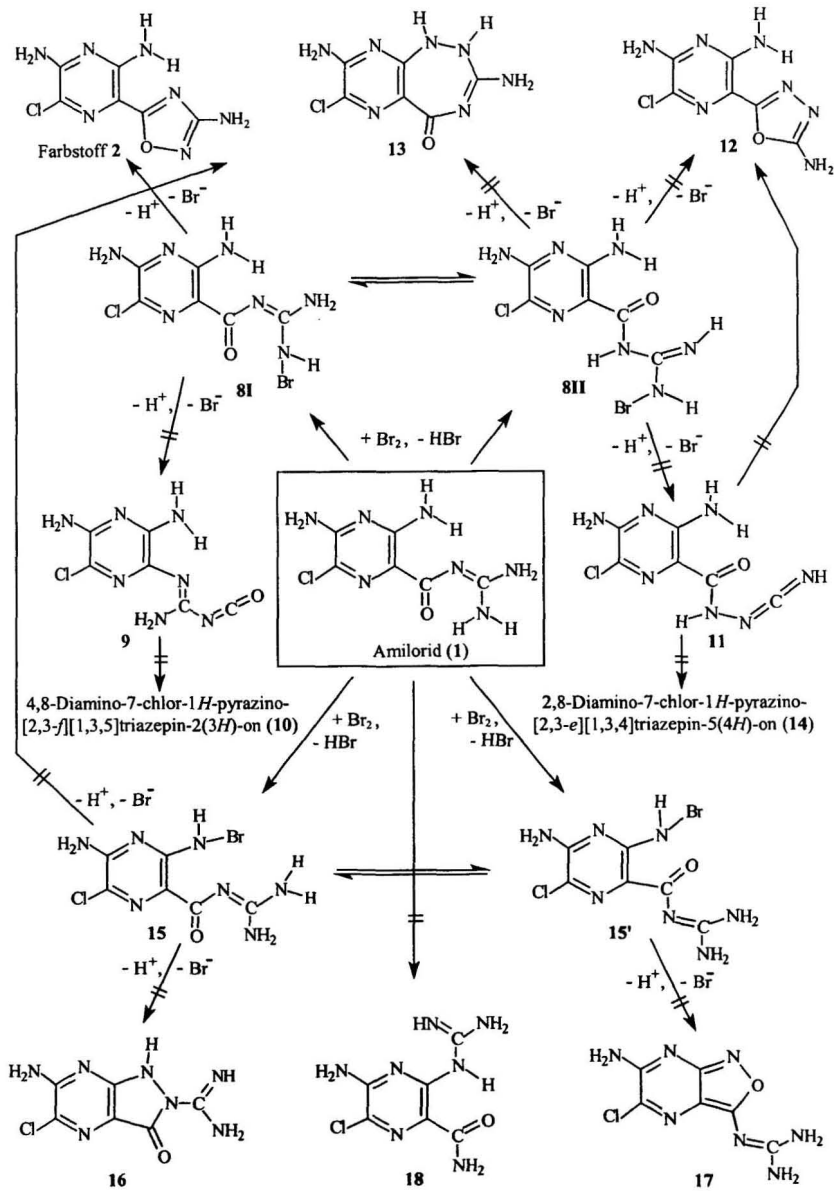
Für die (erwartete) Bildung eines (1:2)-Komplexes mit zusätzlichen Wasserstoffbrücken zwischen einer der beiden Pyrazinamin-Teilstrukturen von **2** und der Carboxylgruppe eines zweiten Moleküls von **7** (siehe Schema 3) wurden keine Hinweise gefunden.

Bei äquimolarer Zugabe von Trifluoressigsäure zur (1:1)-Mischung von **2** und **7** in  $[D_6]$ DMSO bildete sich ebenfalls kein Salz. Dies zeigte die unveränderte Lage der Signale für **2** und **7** im  $^{13}C$ -Spektrum. Im  $^1H$ -Spektrum bleibt die chemische Verschiebung der *o*- und *m*-Protonen von **7** ebenfalls unverändert ( $\delta = 8.15$  und  $8.30$ ), doch erscheinen hier für die Aminprotonen nun sehr breite Signale im Bereich von  $\delta = 6.8 - 8.0$  ( $I = 2$ ) und  $\delta = 9.8 - 12.8$  ( $I = 5-6$ ).

#### *Diskussion des Reaktionsverlaufes*

Wie erwähnt, reagiert Amilorid (**1**) mit Brom und Natronlauge unter Dehydrierung des Guanidincarbonylrestes zum Oxadiazolyipyrazin **2**. Sehr wahrscheinlich entsteht dabei intermediär das 1-Brom-2-(pyrazincarbonyl)guanidin **8I**. Die basenkatalysierte Abspaltung eines Protons induziert dann die Cyclisierung zum Oxadiazolamin **2** (Schema 4). Die genauere Analyse der möglichen Reaktionsabläufe zeigt, daß die Weiterreaktion von **8I** bzw. des tautomeren 1-Brom-3-acylguanidins **8II** ohne Beteiligung des Diaminopyrazinylrestes alternativ auch durch Umlagerung eines Restes, ähnlich wie beim Hofmann-Abbau, eingeleitet werden könnte. Die baseninduzierte Wanderung des Pyrazinylrestes von **8I** bzw. des Acylamidorestes von **8II** zum bromsubstituierten N-1 sowie Abspaltung von Bromid führt ausgehend von **8I** zum 1-Carbonyl-2-pyrazinylguanidin **9** (einem Amidinoisocyanat) bzw. von **8II** zum Amidocarbodiimid **11**. Aus **11** könnte sich durch basenkatalysierten Ringschluß, ohne Beteiligung des Diaminopyrazinylrestes, das 1,3,4-Oxadiazol-2-amin **12**, ein Stellungsisomeres des 1,2,4-Oxadiazol-3-amins **2** bilden. **12** kann auch direkt aus der Bromverbindung **8II**, durch Aneinanderreihung der Umlagerung und des Ringschlusses, in einem Zug entstehen.

Die stellungsisomeren Pyrazinotriazepinone **13** bzw. **10** und **14** (IUPAC-Namen in Schema 4), könnten sich durch Cyclisierung der Intermediate **8II** bzw. **9** und **11** bilden. Anlagerung der Aminogruppen in 3-Stellung der Pyrazine an N-2 (oder an den bromsubstituierten Stickstoff N-1) des Guanidinorestes von **8II** (und Eliminierung von Bromid) gibt **13**, Addition der Pyrazinaminogruppe an den Isocyanat-Kohlenstoff von **9** führt zu Produkt **10**, und bei analoger Cyclisierung von **11** unter Beteiligung des Carbodiimid-Kohlenstoffs entsteht **14**. Da aber bei diesen Ringschlüssen die Diaminopyrazin-Teilstruktur



**Schema 4.** A priori mögliche Reaktionen bei der Umsetzung von Amilorid (1) mit  $\text{Br}_2/\text{NaOH}$

verlorengeht, waren **13**, **10** und **14** als mögliche Strukturen für das Farbprodukt auszuscheiden. Auch die Bildung eines reaktiven 3-Bromaminopyrazins **15** als Intermediat war vorstellbar. Ausgehend von den Isomeren **15** bzw. **15'** hätten sich durch Bromwasserstoffabspaltung und Ringschluß Verbindungen wie das Pyrazolopyrazincarboxamidin **16** bzw. das Isoxazolopyrazinylguanidin **17**, oder aus **15I** auch das schon erwähnte Pyrazinotriazepinon **13** bilden können.

Außerdem kam für die Einleitung der Reaktion auch die Übertragung eines Amidinorestes vom Guanidin auf die 3-Aminogruppe des Amilorid (**1**) in Frage. Die Cyclodehydrierung des gebildeten 3-Guanidino-2-pyrazincarboxamids **18** konnte dann zu einem Isoxazolo- oder Pyrazolopyrazincarboxamidin führen, der Hofmann-Abbau des Amids **18** hingegen zu einem Isocyanat und dessen Ringschluß zu einem Imidazopyrazincarboxamidin (Folgeprodukte nicht im Schema 4). Schließlich war auch die Öffnung des Pyrazinringes von **1** unter Bildung eines Triaminopyrimidinons (Produkt nicht im Schema 4) denkbar.

Das tatsächliche Eintreten der beiden letztgenannten Reaktionsfolgen schien allerdings in Anbetracht der angewendeten sehr milden Reaktionsbedingungen wenig wahrscheinlich. Da auch bei diesen Reaktionen die Pyrazindiamin-Teilstruktur verlorengeht, wurden sie nicht weiter in Erwägung gezogen.

### Experimenteller Teil

Schmelzpunkt: Kofler-Heiztischmikroskop, nicht korrigiert.

Die ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren wurden mit einem Varian 400 MHz Unity Inova Spektrometer mit inversem 5 mm Breitbandprobenkopf und Gradienteneinheit bei einer Meßfrequenz von 399.98 MHz für  $^1\text{H}$  und 100.59 MHz für  $^{13}\text{C}$  aufgenommen. Für die Durchführung der *gs*-HMBC<sup>12</sup>- und 1D-NOE-Differenz<sup>13</sup> Experimente wurden die Standard-Pulsprogramme verwendet. Die einzelnen *gs*-HMBC-Experimente wurde jeweils mit einem Delay von 125, 83, 63, 50, 42, 31 und 25 ms für  $^nJ_{\text{CH}} = 4,6,8,10,12,16$  und 20 Hz optimiert. Für die NOE-Messungen wurden die Proben entgast und  $T_1$ -Bestimmungen durchgeführt. 5-10 mg Substanz wurden in ca. 0.5 ml deuteriertem Lösungsmittel gelöst. Die Werte für die chemische Verschiebung sind in  $\delta/\text{ppm}$  mit *TMS* als internem Standard angegeben. I: Intensität. MS (EI) (70 eV): Finnigan-MAT 8430 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig); R.I.: relative Intensität. FT-IR: ATI Mattson Genesis Series UV-Vis: Philipps PU 8730 UV/VIS-Spektrophotometer. Fluorimeter: Kontron SFM 25. Reagenzien: Ph. Eur. 1997<sup>1</sup>. DC: Polygram® SIL G/UV<sub>254</sub>-Fertigfolien (Macherey-Nagel) 40 x 80 mm, Fließmittel: Chloroform/Methanol = 18:2. HPLC: L-6200A Gradientenpumpe,

AS-2000A Autosampler, D-6000A Interface, L-7450 Dioden-array-Detektor, D-7000 HPLC System Manager (alle Geräte Fa. Merck und Hitachi), Säule LiChroCart 125-4, LiChrospher 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), Vorsäule LiChroCart 4-4, Select B, Flussrate 1.000 ml/min.; isokratisch, Auftragevolumen 20  $\mu\text{l}$ , Detektion 250 nm, Nettoretentionszeit ( $t_{\text{S}}$ ), Totzeit ( $t_{\text{M}}$ ) bestimmt mit Thioharnstoff, Eluent  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN} = 80/20$ . CHN: C-H-N-O-Elemental Analyzer 1106 Carlo Erba. Röntgenstrukturanalyse: vollständige Daten (außer Strukturfaktoren) wurden unter der Nummer CCDC 168635 beim Cambridge Crystallographic Data Centre deponiert und können kostenlos angefordert werden vom Direktor, CCDC, 12 Union Rd., Cambridge. CB2 1EZ, UK. (e-mail: deposit@chemcrs.cam.ac.uk).

*3-(3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-5-chlor-2,6-pyrazindiamin (2)*

0.2 g (0.66 mmol) **1**.HCl werden in 200 ml Wasser gelöst. Zu der Lösung werden 15.5 ml Natriumhydroxid-Lösung 8,5% und 11 ml Bromwasser R gegeben. Dann wird mit Salzsäure 36% auf pH 3.2 eingestellt. Nach Zugabe von 25 ml Natriumthiosulfat-Lösung 0.1 mol/l wird mit 6 x 100 ml *tert*-Butylmethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mit wenig Chloroform gewaschen und abgesaugt. Nach Umkristallisation aus DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  erhält man 2 mg (1%) **3**. Fp: ab 295 °C (Zers.). IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3486 \text{ cm}^{-1}$ , 3471, 3378, 3333, 3164 (N-H), 1662, 1625, 1604, 1584 (C=N, C=C). UV (Dioxan):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 231 nm (3.77), 282 (4.15), 368 (4.27). Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 368 nm):  $\lambda_{\text{max}} = 417 \text{ nm}$ . DC:  $R_f = 0.31$ , blaue Fluoreszenz bei 365 nm. HPLC:  $t_{\text{S}} = 1.47 \text{ min}$ . CHN für  $\text{C}_6\text{H}_6\text{ClN}_7\text{O}$  (227.6). Ber: C 31.66 H 2.66 N 43.08; Gef: C 31.60 H 2.69 N 42.41.

### Literatur

- [1] Europäisches Arzneibuch 1997 (3. Ausgabe): 467, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn
- [2] Shepard K.L., Halczenko W., Cragoe, E.J., Jr. (1969) *Tetrahedron Lett.* **54**: 4757
- [3] Mazzo D.J. (1986) in Florey K. (Hrsg.) *Analytical Profiles of Drug Substances*, Bd. **15**: 1, Academic. Press, New York
- [4] Smith R.L., Cochran D.W., Gund P., Cragoe, E.J., Jr. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 191
- [5] Hartke K., Hartke H., Mutschler E., Rücker G., Wichtl M. (1993) *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch: A 31*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart – Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn

- [6] Sato N. (1989) *J. Heterocycl. Chem.* **26**: 817
- [7] Watthey J.W.H., Desai M., Rutledge R., Dotson R. (1980) *J. Med. Chem.* **23**: 690
- [8] Lessel J. (1993) *Pharmazie* **48**: 812
- [9] Shutske G.M., Agnew M.N. (1981) *J. Heterocycl. Chem.* **18**: 1025
- [10] Bock M.G., Smith R.L., Blaine E.H., Cragoe, E.J., Jr. (1986) *J. Med. Chem.* **29**: 1540
- [11] Gonczi C., Korbonits D., Harsanyi K. (1975) *Chem. Abstr.* 83: P131610k (Ger. Offen 2, 461, 882)
- [12] Kessler H., Oschkinat H., Griesinger C., Bermel W. (1986) *J. Magn. Reson.* **70**: 106
- [13] Kinns M., Sanders J.K.M. (1984) *J. Magn. Reson.* **56**: 518

*Eingelangt am 19. August 2001  
Angenommen am 7. September 2001*