

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580009567.4

[51] Int. Cl.

C07C 37/00 (2006.01)

C07C 39/06 (2006.01)

C07C 41/00 (2006.01)

C07C 69/00 (2006.01)

C07C 255/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 3 月 21 日

[11] 公开号 CN 1934061A

[22] 申请日 2005.3.21

[21] 申请号 200580009567.4

[30] 优先权

[32] 2004.3.26 [33] US [31] 60/556,861

[86] 国际申请 PCT/US2005/009290 2005.3.21

[87] 国际公布 WO2005/097719 英 2005.10.20

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.25

[71] 申请人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州

[72] 发明人 K·库尼特斯基 M·C·夏

S·W·许 B·M·特洛斯特

M·E·沃曼

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李炳爱

权利要求书 5 页 说明书 29 页

[54] 发明名称

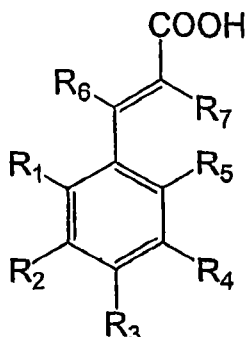
制备羟基苯乙烯及其乙酰化衍生物的方法

[57] 摘要

提供在非胺碱性催化剂存在下,使酚类底物热脱羧制备乙烯基单体的方法。可在同一反应容器中,在乙酰化试剂的存在下,可将脱羧反应产物再乙酰化。

1. 一种用于使酚类底物脱羧制备乙烯基单体的方法，所述方法包括步骤：

a) 提供具有一般结构的酚类底物：



其中 R_1 、 R_3 和 R_5 为 H、OH 或 OCH_3 ； R_2 和 R_4 为 H、OH、 OCH_3 或直链或支链烷基； R_6 和 R_7 为 H、卤素或氰基，条件是 R_1 、 R_3 或 R_5 中的至少一个为 OH，且 R_2 和 R_4 两者不同时为叔丁基；

b) 提供反应混合物，所述混合物包含：

i) 非胺碱性催化剂；和

ii) 至少一种极性有机溶剂或极性有机溶剂混合物；和

c) 在至少约 100°C 下，使(a)中酚类底物与(b)中反应混合物接触足够长时间，使所述酚类底物脱羧为脱羧产物。

2. 权利要求 1 的方法，其中 R_3 为 OH。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述酚类底物选自 4-羟基肉桂酸、阿魏酸、芥子酸、咖啡酸、2-羟基肉桂酸和 α -氰基-4-羟基肉桂酸。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述脱羧产物选自 4-羟基苯乙烯、3-甲氧基-4-羟基苯乙烯、3,5-二甲氧基-4-羟基苯乙烯、3,4-二羟基苯乙烯、2-羟基苯乙烯和 α -氰基-4-羟基苯乙烯。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述非胺碱性催化剂包含钾。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述非胺碱性催化剂为乙酸盐。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述非胺碱性催化剂为金属盐。

8. 权利要求7的方法,其中所述非胺碱性催化剂选自乙酸钾、碳酸钾、氢氧化钾、乙酸钠、碳酸钠、氢氧化钠和氧化镁。

9. 权利要求1的方法,其中相对于所述反应混合物中底物,所述非胺碱性催化剂的浓度为约1 mol%至约30 mol%。

10. 权利要求1的方法,其中所述极性有机溶剂为非质子溶剂。

11. 权利要求10的方法,其中所述非质子极性有机溶剂选自N,N-二甲基甲酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、N,N-二甲基乙酰胺、二甲亚砜、六甲基磷酰胺和六甲基磷酰三胺。

12. 权利要求1的方法,其中所述极性有机溶剂为质子溶剂。

13. 权利要求12的方法,其中所述质子溶剂选自一缩二丙二醇甲醚(Dowanol™ DPM)、二甘醇甲醚、2-丁氧基乙醇、乙二醇、2-甲氧基乙醇、丙二醇甲醚、正己醇和正丁醇。

14. 权利要求1的方法,其中所述反应混合物任选包含阻聚剂。

15. 权利要求14的方法,其中所述阻聚剂选自:氢醌;氢醌单甲醚;4-叔丁基儿茶酚;吩噻嗪;N-氧基(硝基氧化物)阻聚剂:4-羟基-TEMPO (4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基氧基, CAS#2226-96-2)和Uvinul® 4040 P (1,6-亚己基-二(N-甲酰基-N-(1-氧基-2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)胺)。

16. 权利要求15的方法,其中所述阻聚剂为Prostab®5415 (二(1-氧基-2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)癸二酸酯, CAS#2516-92-9)。

17. 权利要求1的方法,其中所述反应混合物任选包含缓聚剂。

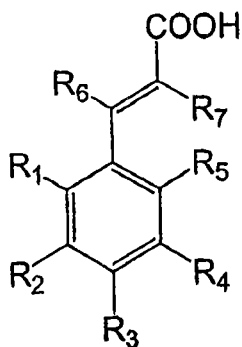
18. 权利要求17的方法,其中所述缓聚剂选自二硝基-邻-甲酚(DNOC)和二硝基丁基苯酚(DNBP)。

19. 权利要求1的方法,其中所述脱羧产物的收率大于63%。

20. 权利要求1的方法,其中所述温度为约100℃至约200℃。

21. 一种由酚类底物合成乙酰化产物的方法,所述方法包括连续
的步骤:

a) 提供具有一般结构的酚类底物:



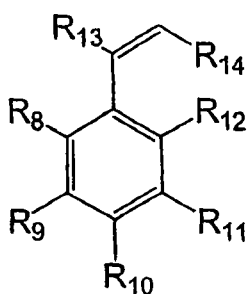
其中 R_1 、 R_3 和 R_5 为 H、OH 或 OCH_3 ； R_2 和 R_4 为 H、OH、 OCH_3 或直链或支链烷基； R_6 和 R_7 为 H、卤素或氰基，条件是 R_1 、 R_3 或 R_5 中的至少一个为 OH；

b) 提供反应混合物，所述混合物包含：

- i) 非胺碱性催化剂；和
- ii) 至少一种非质子极性有机溶剂或非质子极性有机溶剂混合物；

c) 在至少约 100°C 的温度下，使(a)的酚类底物与(b)的反应混合物接触足够长时间，使所述酚类底物脱羧形成脱羧产物；和

d) 使(c)的脱羧产物与乙酰化试剂接触，生成具有以下一般结构的乙酰化产物：



其中 R_8 、 R_{10} 和 R_{12} 为 H、 $O(C=O)CH_3$ 或 OCH_3 ； R_9 和 R_{11} 为 H、OH、 OCH_3 或直链或支链烷基； R_{13} 和 R_{14} 为 H、卤素或氰基；条件是 R_8 、 R_{10} 或 R_{12} 中的至少一个为 $O(C=O)CH_3$ 。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述乙酰化试剂选自乙酸酐、乙酰氯和乙酸。

23. 权利要求 21 的方法，其中所述乙酰化试剂为乙酸酐。

24. 权利要求 21 的方法, 其中所述乙酰化产物选自 4-乙酰氧基苯乙烯、3-甲氧基-4-乙酰氧基苯乙烯、3,5-二甲氧基-4-乙酰氧基苯乙烯、3,4-二乙酰氧基苯乙烯、2-乙酰氧基苯乙烯和 α -氰基-4-乙酰氧基苯乙烯。

25. 权利要求 21 的方法, 其中所述乙酰化产物为 4-乙酰氧基苯乙烯。

26. 权利要求 21 的方法, 其中所述酚类底物选自 4-羟基肉桂酸、阿魏酸、芥子酸、咖啡酸、2-羟基肉桂酸和 α -氰基-4-羟基肉桂酸。

27. 权利要求 21 的方法, 其中所述非胺碱性催化剂包含钾。

28. 权利要求 21 的方法, 其中所述非胺碱性催化剂为乙酸盐。

29. 权利要求 21 的方法, 其中所述非胺碱性催化剂为金属盐。

30. 权利要求 28 的方法, 其中所述非胺碱性催化剂选自乙酸钾、碳酸钾、氢氧化钾、乙酸钠、碳酸钠、氢氧化钠和氧化镁。

31. 权利要求 21 的方法, 其中相对于所述反应混合物中的底物, 所述非胺碱性催化剂的浓度为约 1 mol% 至约 30 mol%。

32. 权利要求 21 的方法, 其中所述非质子极性有机溶剂选自 N,N-二甲基甲酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、N,N-二甲基乙酰胺、二甲亚砜、六甲基磷酰胺和六甲基磷酰三胺。

33. 权利要求 21 的方法, 其中所述反应混合物任选包含阻聚剂。

34. 权利要求 33 的方法, 其中所述阻聚剂选自: 氢醌; 氢醌单甲醚; 4-叔丁基儿茶酚; 吩塞嗪; N-氧基(硝基氧化物)阻聚剂: 4-羟基-TEMPO (4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基氧基, CAS#2226-96-2) 和 Uvinul®4040 P (1,6-亚己基-二(N-甲酰基-N-(1-氧基-2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)胺)。

35. 权利要求 34 的方法, 其中所述阻聚剂为 Prostab®5415 (二(1-氧基-2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)癸二酸酯, CAS#2516-92-9)。

36. 权利要求 21 的方法, 其中所述反应混合物任选包含缓聚剂。

37. 权利要求 36 的方法，其中所述缓聚剂选自二硝基-邻-甲酚(DNOC)和二硝基丁基苯酚(DNBP)。

38. 权利要求 21 的方法，其中所述乙酰化产物的收率大于 63%。

39. 权利要求 21 的方法，其中步骤(c)中温度为约 100℃至约 200℃，和步骤(d)中温度为从室温到约 150℃。

制备羟基苯乙烯及其乙酰化衍生物的方法

本发明涉及有机合成领域。更具体地讲，本发明涉及按两步法，通过热、碱催化使酚类底物脱羧，随后将得到的产物在一个反应容器中乙酰化制备羟基苯乙烯的方法。

发明背景

羟基苯乙烯，例如 4-羟基苯乙烯(pHS)及其乙酰化衍生物(例如 4-乙酰氧基苯乙烯(pAS))是在广泛的工业应用中具有潜在实用性的芳族化合物。例如，这些化合物单体具有制备树脂、弹性体、粘合剂、涂料、汽车涂饰剂、油墨和电子材料的用途。它们还可用作弹性体和树脂制剂中的添加剂。

已知多种化学合成羟基苯乙烯及其乙酰化衍生物的方法。但這些方法需要昂贵的试剂、苛刻的条件，并且收率较低，通常为 30-63%。例如，Sovish (*J. Org. Chem.* 24: 1345-1347 (1959))描述由对-羟基肉桂酸(pHCA)制备 4-羟基苯乙烯(又称对-乙烯基苯酚)的方法。在约 225℃下，使 pHCA 在喹啉中通过铜粉脱羧。4-羟基苯乙烯的收率约 41%。

Pittet 等在美国专利号 4,316,995 中描述制备对-乙烯基苯酚的方法。在该方法中，先用乙二胺作催化剂，使对-羟基苯甲醛与丙二酸反应，得到 pHCA，将它在 115-120℃下原位脱羧，形成不纯的对-乙烯基苯酚。将对-乙烯基苯酚从反应混合物中分离，在碱例如氢氧化钠或氢氧化钾的存在下，使对-乙烯基苯酚与乙酸酐反应，形成 4-乙酰氧基苯乙烯，将它从反应混合物中分离，在强碱的存在下，将它水解，得到纯化的对-乙烯基苯酚。4-乙烯基苯酚的收率约 31%。

Schädeli 在美国专利号 5,274,060 中描述以 pHCA 为原料制备 4-羟基苯乙烯的方法。按该方法，在 135℃下，在胺催化剂即 1,8-二氮

杂双环[5,4-0]十一碳-7-烯和氢醌的存在下,使 pHCA 在二甲亚砜中脱羧,得到 4-羟基苯乙烯。该方法的收率为 63%。

Lala 等在澳大利亚专利申请号 7247129 中描述在非质子溶剂中,用胺催化剂将邻或对-羟基芳基羧酸热脱羧,形成乙烯基衍生物的方法。另外,还描述通过原位形成羟基芳基羧酸,随后进行热脱羧制备乙烯基羟基芳基化合物的方法。通过使脂族二羧酸或脂族酸酐与羟基芳醛在碱性介质中反应,形成羟基芳基羧酸。这些方法的收率范围在 15-60%内。

Steinmann 在美国专利号 5,324,804 中描述,在 150℃下,无催化剂存在下,通过使咖啡酸在二甲基甲酰胺中热脱羧合成 3,4-二羟基苯乙烯。该方法未报道收率。

Munteanu 等(*J. Thermal Anal.* 37: 411-426 (1991))描述通过非质子偶极溶剂中,用和不用非胺碱性催化剂,将反式-3,5-二-叔丁基-4-羟基肉桂酸热分解,制备 3,5-二-叔丁基-4-羟基苯乙烯。报道的收率是 95%。在该发明公开中,未描述将其它肉桂酸衍生物热脱羧。

已研究过使取代的肉桂酸在水性介质中热脱羧。Pyysalo 等(*Lebensmittel-Wissenschaft u. Technol.* 10 (Food Science and Technology): 145-147 (1977))描述在 pH 1-6,在 100℃下,将取代的肉桂酸衍生物在缓冲水溶液中热脱羧。Cohen 等(*J. Amer. Chem. Soc.* 82: 1907-1911 (1960))描述在 pH 1-12,使对-羟基肉桂酸在缓冲水溶液中热脱羧。在那些发明公开中,未报道脱羧产物的分离。

因此,对用相对廉价的试剂、相对温和的条件和收率高的制备羟基苯乙烯及其乙酰化衍生物的方法存在需要。

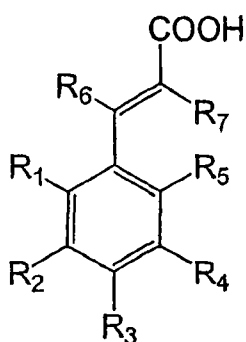
申请人通过发现用相对廉价的试剂,在相对温和的条件下,收率最高达 100%的制备羟基苯乙烯及其乙酰化衍生物的方法,解决了所述问题。在非胺碱性催化剂的存在下,通过使酚类底物热脱羧制备羟基苯乙烯。通过使得到的羟基苯乙烯与乙酰化试剂在同一反应容器中反应,形成乙酰化衍生物。

发明概述

本发明涉及在非胺碱性催化剂的存在下，使酚类底物热脱羧的方法。可在乙酰化试剂的存在下，使脱羧反应产物在同一反应容器中再乙酰化。可任选将阻聚剂或缓聚剂加入反应混合物。脱羧或乙酰化产物的收率通常超过 63%。

因此在本发明范围内，提供使酚类底物脱羧制备乙烯基单体的方法，该方法包括以下步骤：

a) 提供具有以下一般结构的酚类底物：



其中 R_1 、 R_3 和 R_5 为 H、OH 或 OCH_3 ； R_2 和 R_4 为 H、OH、 OCH_3 或直链或支链烷基； R_6 和 R_7 为 H、卤素或氰基，条件是 R_1 、 R_3 或 R_5 中的至少一个为 OH，且 R_2 和 R_4 两者不同时为叔丁基；和

b) 提供反应混合物，该混合物包含

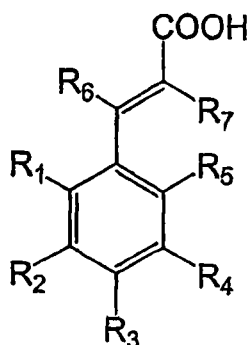
i) 非胺碱性催化剂；和

ii) 至少一种极性有机溶剂或极性有机溶剂混合物；和

c) 在至少约 100℃ 下，使(a)的酚类底物与(b)的反应混合物接触足够长时间，使酚类底物脱羧为脱羧产物。可任选通过本领域中熟知的方法回收脱羧产物。

在另一个实施方案中，本发明提供由酚类底物合成乙酰化产物的方法，该方法包括以下连续的步骤：

a) 提供具有以下一般结构的酚类底物:



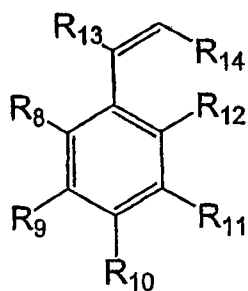
其中 R_1 、 R_3 和 R_5 为 H、OH 或 OCH_3 ; R_2 和 R_4 为 H、OH、 OCH_3 或直链或支链烷基; R_6 和 R_7 为 H、卤素或氰基, 条件是 R_1 、 R_3 或 R_5 中的至少一个为 OH; 和

b) 提供反应混合物, 该混合物包含:

- i) 非胺碱性催化剂; 和
- ii) 至少一种极性非质子有机溶剂或极性非质子有机溶剂混合物; 和

c) 在至少约 100°C 下, 使(a)的酚类底物与(b)的反应混合物接触足够长时间, 以使酚类底物脱羧形成脱羧产物;

d) 使 c)的脱羧产物与乙酰化试剂接触, 制备具有以下一般结构的乙酰化产物:



其中 R_8 、 R_{10} 和 R_{12} 为 H、 $O(C=O)CH_3$ 或 OCH_3 ; R_9 和 R_{11} 为 H、OH、 OCH_3 或直链或支链烷基; R_{13} 和 R_{14} 为 H、卤素或氰基; 条件是 R_8 、 R_{10} 或 R_{12} 中的至少一个为 $O(C=O)CH_3$ 。

发明详述

本发明提供通过非胺碱催化使酚类底物热脱羧,制备羟基苯乙烯的方法。可通过加入乙酰化试剂,使得到的羟基苯乙烯在同一反应容器中乙酰化。该方法有用,因为羟基苯乙烯及其乙酰化衍生物具有作为单体用于制备树脂、弹性体、粘合剂、涂料、汽车涂饰剂、油墨、电子材料以及弹性体和树脂制剂中的添加剂的用途。

在本文中使用以下定义,解释权利要求和说明书时应参考它们。

"p"表示对位。

"pAS"是对-乙酰氧基苯乙烯的缩写,它也代表对-乙酰氧基苯乙烯或 4-乙酰氧基苯乙烯。

"pHS"是对-羟基苯乙烯的缩写,它也代表对-羟基苯乙烯或 4-羟基苯乙烯。

"CA"表示肉桂酸。

本文中使用的术语“收率”是指在化学反应中得到的产物量。收率通常表示为反应理论收率的百分率。术语“理论收率”表示根据初始存在的底物量和反应的化学计量所预计的产物量。

应用于本发明溶剂的术语“极性”是指特征在于具有相当大的永久性偶极矩的分子的溶剂。

应用于本发明溶剂的术语“非质子”是指不能起不稳定质子供体或受体作用的溶剂。

应用于本发明溶剂的术语“质子”是指能起不稳定质子供体或受体作用的溶剂。

术语“极性有机溶剂混合物”是指含至少一种极性溶剂的有机溶剂混合物。

术语“非质子极性有机溶剂混合物”是指含至少一种非质子极性溶剂的有机溶剂混合物。

"TAL"是酪氨酸脱氨酶的缩写。

"PAL"是苯丙氨酸脱氨酶的缩写。

"PAH"是苯丙氨酸羟化酶的缩写。

术语"TAL 活性"是指蛋白质催化将酪氨酸直接转化为 pHCA 的能力。

术语"PAL 活性"是指蛋白质催化将苯丙氨酸转化为肉桂酸的能力。

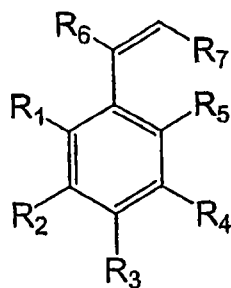
"*pal*"代表编码具有 PAL 活性的酶的基因。

"*tal*"代表编码具有 TAL 活性的酶的基因。

术语"PAL/TAL 活性"或"PAL/TAL 酶"是指具有 PAL 和 TAL 两种活性的蛋白质。这种蛋白质作为酶底物具有至少一些对酪氨酸和苯丙氨酸的特异性。

术语“P-450/P-450 还原酶系统”是指负责将肉桂酸催化转化为 pHCA 的蛋白质系统。P-450/P-450 还原酶系统是本领域中已知的具有肉桂酸 4-羟化酶功能的几种酶或酶系统中的一种。本文中使用的术语“肉桂酸 4-羟化酶”是指导致肉桂酸转化为 pHCA 的一般酶活性，而术语“P-450/P-450 还原酶系统”是指具有肉桂酸 4-羟化酶活性的特异性二元蛋白质系统。

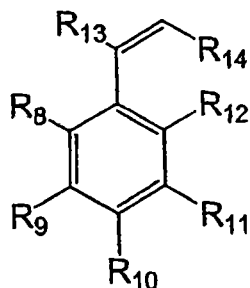
本文中给出的所有范围包括范围的端值和所有的中间范围点。本发明包括制备具有以下一般结构的乙烯基单体尤其羟基苯乙烯的方法：



其中 R_1 、 R_3 和 R_5 为 H、OH 或 OCH_3 ； R_2 和 R_4 为 H、OH、 OCH_3 或直链或支链烷基； R_6 和 R_7 为 H、卤素或氰基，条件是 R_1 、 R_3 或 R_5 中至少一个为 OH，其中优选 R_2 和 R_4 两者不同时为叔丁基。可通过本发明方法制备的羟基苯乙烯的实例包括但不限于 4-羟基苯乙烯、3-

甲氧基-4-羟基苯乙烯、3,5-二甲氧基-4-羟基苯乙烯、3,4-二羟基苯乙烯、2-羟基苯乙烯和 α -氰基-4-羟基苯乙烯。

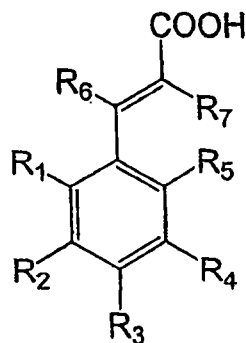
另外,可通过将乙酰化试剂加入反应容器,将得到的羟基苯乙烯乙酰化,得到具有以下一般结构的乙酰化产物:



其中 R_8 、 R_{10} 和 R_{12} 为 H、 $O(C=O)CH_3$ 或 OCH_3 ; R_9 和 R_{11} 为 H、OH、 OCH_3 或直链或支链烷基; R_{13} 和 R_{14} 为 H、卤素或氰基,条件是 R_8 、 R_{10} 或 R_{12} 中至少一个为 $O(C=O)CH_3$ 。乙酰化产物的实例包括但不限于 4-乙酰氧基苯乙烯、3-甲氧基-4-乙酰氧基苯乙烯、3,5-二甲氧基-4-乙酰氧基苯乙烯、3,4-二乙酰氧基苯乙烯、2-乙酰氧基苯乙烯和 α -氰基-4-乙酰氧基苯乙烯。

酚类底物

用于本发明的酚类底物具有一般结构:



其中 R_1 、 R_3 和 R_5 是 H、OH 或 OCH_3 ; R_2 和 R_4 是 H、OH、 OCH_3 或直链或支链烷基; R_6 和 R_7 是 H、卤素或氰基,条件是 R_1 、 R_3 或 R_5 中的至少一个是 OH。合适的酚类底物的实例包括但不限于 4-羟基肉桂酸、阿魏酸、芥子酸、咖啡酸、2-羟基肉桂酸和 α -氰基-4-羟基肉桂酸。发现即使用非空间位阻酚底物也能得到高收率的脱羧产物,

非空间位阻酚底物比空间位阻酚更易使产物分解。在本文中，空间位阻酚定义为在 R_2 和 R_4 位都具有体积较大基团例如叔丁基的酚。非空间位阻酚是在 R_2 和 R_4 位都没有体积较大基团的酚。非空间位阻酚底物包括但不限于以下的酚：其中 R_2 或 R_4 中至少一个是 H、OH、 OCH_3 、甲基、乙基或丙基。此外，发现即使用邻位未取代的酚底物也能得到高收率的脱羧产物，邻位未取代的酚底物也容易使产物分解。在本文中，邻位未取代的酚定义为其中 R_2 或 R_4 中的至少一个是 H 的酚。

可按多种方法得到这些酚类底物。例如主要为反式的 4-羟基肉桂酸(pHCA)可从公司例如 Aldrich (Milwaukee, WI)和 TCI America (Portland, OR)购得。另外，可通过化学合成，用本领域中已知的任何方法制备 pHCA。例如，按 Pittet 等在美国专利号 4,316,995 或按 Alexandratos 在美国专利号 5,990,336 中所述，可通过使丙二酸与对羟基苯甲醛反应，得到 pHCA。或者，也可从植物中分离 pHCA (R. Benrief 等 *Phytochemistry* 47: 825-832 (1998)和美国专利申请公布号 20020187207)。在一个实施方案中，pHCA 的来源来自使用生产宿主的生物制备。在另一个实施方案中，生产宿主是可用标准 DNA 技术制备的重组宿主细胞。Sambrook, J., Fritsch, E. F.和 Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)对这些重组 DNA 技术进行描述，该文献通过引用结合到本文中。

在一个实施方案中，按 Qi 等在美国专利申请公布号 20030079255 中所述制备 pHCA，该专利申请通过引用结合到本文中。根据该发明公开，可用表达至少一种编码苯丙氨酸羟化酶(PAH)活性的基因，和至少一种编码酪氨酸脱氨酶(TAL)活性的基因的重组微生物工程制备 pHCA。该转化微生物将可发酵的碳源例如葡萄糖代谢为苯丙氨酸，它通过 PAH 转化为酪氨酸。生成的酪氨酸通过 TAL 酶转化为 pHCA。可使用具有 TAL 活性的任何合适的酶。例如可使用具有 PAL 和 TAL

(PAL/TAL)两种活性的酶。按 Gatenby 等在美国专利号 6,368,837 中所述,也可使用通过诱变野生型酵母 PAL 酶产生的 TAL 活性增加的 TAL 酶。或者,可使用 Breinig 等在美国专利申请公布号 20040023357 中所述的可自丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)诱导产生的 TAL 酶或细菌 TAL 酶,例如 Kyndt 等(*FEBS Lett.* 512: 240-244 (2002))或 Huang 等在美国专利申请公布号 20040059103)中所述的细菌 TAL 酶。

在另一个实施方案中,按 Gatenby 等(同上)公开的任一方法制备 pHCA,其通过引用结合到本文中。例如,可用表达编码酵母 PAL 活性的基因和编码植物 P-450/P-450 还原酶系统的基因的重组微生物工程制备 pHCA。该转化微生物将可发酵的碳源例如葡萄糖代谢为苯丙氨酸,通过 PAL 酶将它转化为肉桂酸(CA)。通过 P-450/P-450 还原酶系统作用,CA 随后转化为 pHCA。或者,可用表达编码 TAL 活性的基因的重组微生物制备 pHCA。TAL 酶可直接将酪氨酸转化为 pHCA。可使用任何合适的 TAL 酶,同上所述。

在另一个实施方案中,按 Ben-Bassat 在共同待审和共同拥有的美国专利申请号 60/563633 中所述,用两阶段发酵法制备 pHCA,该专利申请通过引用结合到本文中。第一阶段包括提供具有提高产生芳族氨基酸酪氨酸能力的微生物生产宿主(过度生产者)。在生长培养基中,使这些细胞在酪氨酸聚集点的生理 pH 下生长。在发酵的第二阶段期间,在 pH 约 8.0 至约 11.0 下,使细胞与 TAL 源接触。在该阶段期间,酪氨酸以相对高的速率和收率转化为 pHCA。或者,可按两个单独的步骤完成这两个阶段,其中使酪氨酸从第一步骤的发酵培养基分离,然后与 TAL 源接触。

对于生物制备 pHCA,使所用的微生物在发酵罐中,在合适的生长培养基中培养。可使用任何合适的发酵罐,包括搅拌罐式发酵器、气升式发酵罐、鼓泡式发酵罐或其任何组合。微生物和发酵科学领域技术人员熟知用于微生物培养物保养和生长的材料和方法(参见,例如 Bailey 等 *Biochemical Engineering Fundamentals*, 第二版,

McGraw Hill, New York, 1986)。用本领域已知的方法，可将生物制备的 pHCA 从用于本发明的发酵培养基中分离。例如，可通过离心将固体从发酵培养基中除去。然后，pHCA 可通过酸化培养基来沉淀，并通过离心回收。如需要可进一步纯化 pHCA，例如用有机溶剂萃取。

类似地，阿魏酸、芥子酸和咖啡酸可从公司例如 Aldrich (Milwaukee, WI) 和 TCI America (Portland, OR) 购得。另一方面，因为这些底物均是天然植物产物，包含木质素生物合成途径的成分，所以可容易地将它们从植物组织分离(参见，例如 Jang 等 *Archives of Pharmacal Research* (2003), 26 (8), 585-590; Matsufuji 等 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003), 51 (10), 3157-3161; WO 2003046163; Couteau 等 *Bioresource Technology* (1998), 64(1), 17-25; 和 Bartolome 等 *Journal of the Science of Food and Agriculture* (1999), 79(3), 435-439)。另外，已知许多更普通的酚类底物的化学合成方法(参见，例如 WO 2002083625 ("Preparation of ferulic acid dimers and their pharmaceutically acceptable salts, and use thereof for treating dementia" 阿魏酸二聚物及其药学上可接受的盐的制备及其治疗痴呆的用途) JP 2002155017 ("Preparation of caffeic acid from ferulic acids" 用阿魏酸制备咖啡酸); 和 Taniguchi 等 *Anticancer Research* (1999), 19(5A), 3757-3761)。Lala 等在澳大利亚专利申请号 7247129 中描述烷基化 pHCA 衍生物的制备。

非胺碱性催化剂

本发明方法利用非胺碱性催化剂。非胺碱性催化剂是任何能够促进不含胺的本发明反应的碱性化合物。通过对比，含胺催化剂的实例是吡啶和乙二胺。实际上，可使用与本发明反应条件相容的任何非胺碱性催化剂，其中优选金属盐，尤其钾盐或乙酸盐。尤其适用于本发明的催化剂包括但不限于乙酸钾、碳酸钾、氢氧化钾、乙酸钠、碳酸钠、氢氧化钠和氧化镁。

本发明中所有非胺催化剂均可从例如 EM Science (Gibbstown, NJ)或 Aldrich (Milwaukee, WI)购得。

非胺碱性催化剂的最佳浓度根据底物的浓度、所用的溶剂性质和反应条件而变化。通常，优选相对于反应混合物中的底物约 1 mol% 至约 30 mol% 浓度。

有机溶剂

对于仅进行脱羧反应，可使用很多种有机溶剂，包括非质子极性有机溶剂和质子极性有机溶剂。可使用单一质子极性溶剂或单一非质子极性溶剂。另外，可使用非质子极性溶剂的混合物、质子极性溶剂的混合物、非质子和质子极性溶剂的混合物以及含非极性溶剂的非质子或质子溶剂的混合物，其中优选非质子极性溶剂或其混合物。合适的非质子极性溶剂包括但不限于 N,N-二甲基甲酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、六甲基磷酰胺和六甲基磷酰三胺(hexamethylphosphorous triamide)。合适的质子极性溶剂包括但不限于一缩二丙二醇甲醚(Dowanol™ DPM)、二甘醇甲醚、2-丁氧基乙醇、乙二醇、2-甲氧基乙醇、丙二醇甲醚、正己醇和正丁醇。

对于两步脱羧-乙酰化方法，有机溶剂应具有非质子和极性特性。可使用单一非质子极性溶剂，或可使用非质子极性溶剂的混合物。或者，非质子极性溶剂和非极性溶剂可组合使用；但质子溶剂不理想，因为它们的反应性易消耗乙酰化试剂。尤其适用于本发明两步法的溶剂包括但不限于 N,N-二甲基甲酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、N,N-二甲基乙酰胺、二甲亚砷、六甲基磷酰胺和六甲基磷酰三胺。

阻聚剂

阻聚剂有用，但本发明方法不要求。可使用任何耐受本发明中所述脱羧反应所需温度的合适的阻聚剂。合适的阻聚剂的实例包括但不限于氢醌、氢醌单甲醚、4-叔丁基儿茶酚、吩噻嗪、N-氧基(硝

基氧化物(nitroxide))阻聚剂, 包括 Prostab®5415 (二(1-氧基-2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)癸二酸酯, CAS#2516-92-9, Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, NY 有售)、4-羟基-TEMPO (4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基氧基, CAS#2226-96-2, TCI America 有售)和 Uvinul®4040 P (1,6-亚己基-二(N-甲酰基-N-(1-氧基-2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)胺, BASF Corp. Worcester, MA 有售)。

缓聚剂

在某些情况下, 在本发明反应中最好组合使用缓聚剂和阻聚剂。缓聚剂为本领域所熟知, 并为减缓聚合反应但不完全阻滞反应的化合物。普通缓聚剂是芳族硝基化合物, 例如二硝基-邻-甲酚(DNOC)和二硝基丁基苯酚(DNBP)。制备缓聚剂的方法在本领域中是普通和熟知的(参见, 例如美国专利 6,339,177; Park 等 Polymer (Korea) (1988), 12(8), 710-19), 它们控制苯乙烯聚合的用途已被文献充分证明(参见, 例如 Bushby 等 Polymer (1998), 39(22), 5567-5571)。

反应条件

将酚类底物、非胺碱性催化剂和有机溶剂加入反应容器, 形成反应混合物。可使用任何合适的反应容器。

反应温度可根据底物浓度、形成的产物稳定性、选择的催化剂和需要的收率而变化。通常, 至少约 100℃是合适的, 其中至少约 100℃至约 200℃范围内的温度与有效制备产物是一致的。对于使用 4-羟基肉桂酸作底物的反应, 优选的温度范围是约 120℃至约 150℃。对于生成较不稳定产物例如咖啡酸的底物, 使用约 100℃至约 120℃范围内的较低温度。对于产生更稳定的产物例如 3,5-二甲基-4-羟基肉桂酸的底物, 可使用约 150℃至约 200℃范围内的较高温度。

除可使用约 500 psig (3447 kPa)压力外, 反应可在常压至约 1000 psig (6895 kPa)压力下进行。可用惰性气体, 例如氮气调节压力。对

于高压反应，可使用任何常规压力反应容器，包括但不限于摇摆式容器、旋转式容器和搅拌式高压釜。

对于反应时间没有限制；但大多数反应进行小于 4 小时，典型的反应时间为约 45 分钟至约 180 分钟。

使羟基苯乙烯乙酰化

在一个实施方案中，脱羧反应结束后，通过将乙酰化试剂直接加入反应混合物使脱羧酚类产物转化为乙酰化衍生物。通常，加入过量的乙酰化试剂，其中优选相对于底物至少 1 mol 当量浓度。合适的乙酰化试剂包括但不限于乙酸酐、乙酰氯和乙酸。在一个实施方案中，乙酰化试剂是乙酸酐。

可在约 25℃ 至约 150℃ 温度下，另外在约 100℃ 至约 140℃ 温度下，在常压至约 1000 psig (6895 kPa) 的压力范围内进行乙酰化反应，反应收率高。本领域技术人员会认识到，应使用使底物和催化剂均可溶解的温度。最简单的方法是在脱羧反应步骤完成后，立即加入乙酰化试剂，在与脱羧反应相同的温度下进行乙酰化。

分离和纯化脱羧和乙酰化产物

反应结束后，可用本领域中已知的任何合适的方法，分离脱羧产物或乙酰化产物。例如，可将反应混合物倾入冰水中，萃取到有机溶剂例如乙酸乙酯或乙醚中。然后，可通过采用减压蒸发将溶剂除去，回收产物。在一个实施方案中，羟基苯乙烯产物的产物收率至少是理论收率的 63%。在另一个实施方案中，乙酰化产物的收率至少是理论收率的 63%。

可用本领域熟知的重结晶、真空蒸馏、闪蒸馏或层析技术进一步纯化脱羧产物或其乙酰化衍生物。

然后，得到的羟基苯乙烯或其乙酰化衍生物可用作制备树脂、弹性体、粘合剂、涂料、汽车涂饰剂、油墨的单体，和用作弹性体和树脂制剂中的添加剂。

实施例

通过以下实施例，进一步明确本发明。应理解，这些实施例虽然指出是优选的本发明实施方案，但给出这些实施例仅用于举例说明。根据以上论述和这些实施例，本领域技术人员可确定本发明的必要特征，并且不偏离本发明的宗旨和范围，可对本发明进行各种变化和修改，以使其适应各种用途和条件。

使用的缩写含义如下："min"表示分钟，"h"表示小时，"sec"表示秒，"mL"表示毫升，"L"表示升，" μ L"表示微升，" μ m"表示微米，"mol"表示摩尔，"mmol"表示毫摩尔，"g"表示克，"mg"表示毫克，"ppm"表示百万分数，"M"表示体积摩尔浓度，"m"表示质量摩尔浓度，"eq"表示当量，"v/v"表示体积与体积比，"Pa"表示帕斯卡，"mPa"表示毫帕斯卡，"psig"表示磅/英寸²度量，"MHz"表示兆赫，"TLC"表示薄层层析，"HPLC"表示高效液相色谱，"LC-MS"表示液相色谱-质谱，"NMR"表示核磁共振波谱，"DMF"表示N,N-二甲基甲酰胺，"DMAc"表示N,N-二甲基乙酰胺，"NMP"表示1-甲基-2-吡咯烷酮，"nd"表示未检出，"kPa"表示千帕斯卡，"rpm"表示转数/分钟和"UV"表示紫外线。

通用方法:

试剂:

除另有说明外，对-羟基肉桂酸来自 Aldrich (Milwaukee, WI)或 TCI America (Portland, OR); 3,4-二羟基肉桂酸来自 Aldrich。所有溶剂均为试剂级，来自 Aldrich。使用的碱性催化剂来自 Aldrich 或 EM Science (Gibbstown, NJ)。阻聚剂 Prostab®5415 来自 Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, NY。

分析方法:

TLC 法:

用硅胶 60F₂₅₄ (EM Science)作固体载体进行 TLC。用乙酸乙酯和己烷 1:1 的混合物作流动相, 分析 pHCA; 用乙酸乙酯和己烷 1:4 的混合物作流动相, 分析 pHS。将样品与 pHCA 和 pHS 标准品对比。用紫外灯, 在 254 nm 处观察 TLC 板。

HPLC 方法:

方法 1: 使用带反相 Zorbax SB-C8 柱(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm, 由 MAC-MOD Analytical Inc. Chadds Ford, PA 提供)的 Agilent 1100 HPLC 系统(Agilent Technologies, Wilmington, DE)。用两种溶剂组合的梯度: 溶剂 A: 0.1%三氟乙酸/HPLC 级水; 和溶剂 B: 0.1%三氟乙酸/乙腈, 完成 HPLC 分离。流动相流速为 1.0 mL/min。使用的溶剂梯度列于表 1。采用温度 45℃, 进样体积 5 μL。

表 1
用于 HPLC 方法 1 的溶剂梯度

时间(min)	溶剂 A	溶剂 B
0	95%	5%
8	20%	80%
10	20%	80%
11	95%	5%

每次运行后, 用 95%A 和 5% B 的溶剂混合物将柱再平衡 5 min。

用标准 pHS 溶液制作合适的校正曲线。用类似于 Leuteritz 等 (Polymer Preprints 43(2): 283-284 (2002))所述的方法, 由乙酰氧基苯乙烯制备用于标准品的 pHS。根据 HPLC 峰面积, 用校正曲线确定每个样品中的 pHCA 和 pHS 重量百分率。通过该信息和取样时反应混合物总重量, 计算 pHCA 转化百分率和 pHS 百分收率。

方法 2: 使用带反相 Zorbax SB-C18 柱(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm, 由 Agilent Technologies 提供)的 Agilent 1100 HPLC 系统。用两种

溶剂组合的梯度: 溶剂 A: 0.1%三氟乙酸/HPLC 级水; 和溶剂 B: 0.1%三氟乙酸/乙腈, 完成 HPLC 分离。流动相流速为 1.25 mL/min。使用的溶剂梯度列于表 2。采用温度 40℃, 进样体积 1 μ L。

表 2
用于 HPLC 方法 2 的溶剂梯度

时间(min)	溶剂 A	溶剂 B
0	90%	10%
35	35%	65%
35.1	90%	10%
45	90%	10%

按上述方法制作合适的校正曲线, 用校正曲线根据 HPLC 峰面积, 确定每个样品中 pHCA 和 pHs 的重量百分率。通过该信息和每次反应混合物总重量(包括对脱羧时 CO₂ 损失的校正), 计算 pHCA 和 pHs 相对时间的重量和摩尔数。

方法 3: 使用带反相 Zorbax XDB-C18 柱, 2.1×50mm (由 Agilent Technologies 提供)的 Agilent 1100 HPLC 系统。用两种溶剂组合的梯度: 溶剂 A: HPLC 级水+ 0.05%三氟乙酸; 和溶剂 B: HPLC 级乙腈 + 0.05%三氟乙酸, 完成 HPLC 分离。在 4.5 分钟内梯度是 95% A 至 0% A, 保持 0.5 分钟, 然后返回初始条件。流动相流速为 0.8 mL/min。采用温度 60℃, 进样体积 1 μ L。

方法 4: 使用带反相 Zorbax SB-C18 柱(4.6 mm ×150 mm, 3.5 μ m, 由 Agilent Technologies 提供)的 Agilent 1100 HPLC 系统。用两种溶剂组合的梯度: 溶剂 A: 0.1%三氟乙酸/HPLC 级水; 和溶剂 B: 0.1%三氟乙酸/乙腈, 完成 HPLC 分离。流动相流速为 1.0 mL/min。使用的溶剂梯度列于表 3。采用温度 40℃, 进样体积 1 μ L。

表 3

用于 HPLC 方法 4 的溶剂梯度

时间(min)	溶剂 A	溶剂 B
0	95%	5%
10	100%	0%
12	100%	0%
12.5	95%	5%

按上述方法制作合适的校正曲线, 根据 HPLC 峰面积, 用校正曲线确定每个样品中 pHCA 和 pHs 的重量百分率。通过该信息和每次反应混合物总重量(包括对脱羧时 CO₂ 损失的校正), 计算 pHCA 和 pHs 相对时间的重量和摩尔数。

¹H NMR:

用 500 MHz Bruker DRX (Bruker NMR, Billerica, MA)得到质子 NMR 数据。

LC-MS 方法:

用 Hewlett Packard LC/MSD 系列 1100 仪器(Agilent Technologies, Wilmington, DE)进行 LC-MS 分析。用 Zorbax Eclipse XDB-C18 柱(2.1 mm × 50 mm, MAC-MOD Analytical Inc.)进行 LC 分离, 溶剂梯度由两种溶剂组成: 溶剂 A: 0.05%三氟乙酸/水; 和溶剂 B: 0.05%三氟乙酸/乙腈。在 4.5 min 内梯度由 95%溶剂 A 至 0%溶剂 A, 随后 0%溶剂 A 保持 2.5 min, 然后返回 95%溶剂 A, 流速 0.8 mL/min。在 60 °C 下, 220 nm 检测波长进行 LC 分离。

在以下的 ¹H NMR 数据中, And = 和。

实施例 1-13

通过使对-羟基肉桂酸脱羧制备 4-羟基苯乙烯

这些实施例的目的是通过在阻聚剂的存在下，用碱性催化剂和溶剂的各种组合使对-羟基肉桂酸热碱催化脱羧，制备4-羟基苯乙烯。

在这些实施例中，在1 mL 溶剂中，用对-羟基肉桂酸作酚类底物，浓度1 M。用于这些实施例中的碱性催化剂和溶剂列于表4。使用的碱性催化剂浓度相对于酚类底物为3 mol%。用于所有反应的阻聚剂 Prostab® 5415 浓度均为1000 ppm。反应在150℃下，在500 psig 氮气下，在特制的微型模块(mini-block)压力反应器中进行。微型模块压力反应器是不锈钢反应器，设计容纳8支1-2 mL 玻璃瓶，每瓶含单独的反应混合物。260℃时该反应器的最大额定压力为1250 psig。含反应混合物的玻璃瓶装入反应器后，将反应器封闭，用氮气加压，用模块加热器加热。

反应时间1 h后，将反应器减压，按上述方法1，通过HPLC 分析反应混合物的样品。每个实施例在反应中消耗的酚类底物量(pHCA 转化率)和4-羟基苯乙烯收率见表4。

表 4
用于实施例 1-13 中的碱性催化剂和溶剂组合

实施例	溶剂	碱性催化剂	pHCA 转化率(%)	产物收率(%)
1	DMF	乙酸钾	99.8	88.8
2	DMAc	甲醇钠	90.7	81.5
3	2-庚酮	碳酸钾	64.2	68.2
4	甲苯/DMF (80/20 v/v)	氧化镁	98.9	55.0
5	γ -丁内酯	氢氧化钾	99.9	78.7
6	DMF	氢氧化钾	99.7	95.2
7	二甘醇二甲醚	乙酸钾	7.2	30.8
8	2-庚酮	甲醇钠	-7.7	9.6
9	甲苯/DMF	碳酸钾	67.1	49.0
10	γ -丁内酯	氧化镁	3.7	20.4
11	DMF	碳酸钾	99.8	84.9
12	DMF	乙酸钾	99.0	106.9
13	NMP	乙酸钾	99.7	107.2

由表 4 结果可知, 在 DMF、DMAc 和 NMP 中, 用乙酸钾、甲醇钠、氢氧化钾和碳酸钾作碱性催化剂, 得到的产物收率最高。

实施例 14

用乙酸钾作碱性催化剂, 在 DMF 中使对-羟基肉桂酸脱羧制备 4-羟基苯乙烯

该实施例的目的是在阻聚剂(1000 ppm Prostab®5415)的存在下, 通过用乙酸钾(10 mol%)作碱性催化剂, 在 DMF 中热、碱催化使对-羟基肉桂酸脱羧, 制备 4-羟基苯乙烯。向 3 颈圆底烧瓶中加入 pHCA (5 g, 30.458 mmol, 1 当量)、30 mL DMF (制成 1 M 的 pHCA 溶液)、1000 ppm Prostab®5415 (5 mg)和乙酸钾(0.3 g, 10 mol%)。在氮气下, 在搅拌和回流冷凝器冷凝下进行反应。用油浴和控温器(带超温保护)将反应物加热至 150℃。乙酸钾在室温下不溶, 但加热后溶解, 得到浅黄

色溶液。同上述，通过 TLC 监测反应。在 150℃下，1.5 h 后，TLC 测定表明反应完全。停止加热，使反应混合物冷却至室温。然后将反应混合物倾入 100 mL 冰水中，用氯化钠饱和，用乙酸乙酯萃取两次(75 mL/次，两次)。将两次萃取的有机层合并，依次用 100 mL 2% NaHCO₃ 溶液、100 mL 水洗涤。有机层经 Na₂SO₄ 干燥，过滤，在旋转蒸发仪上蒸发浓缩。将残渣在 -20℃ 下储存过夜。然后，将残渣进一步减压(10 Pa)干燥，得到 3.44 g 浅黄色/黄褐色固体(理论收率的 94%)。用 ¹H NMR 分析产物。

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ (ppm) 7.998 (0.04H, s), 7.275 (2H, ABq, J=9.0 Hz), 6.758 (2H, ABq, J=9.1 Hz), 6.65 (1H, dd, J=17.6 and 11.0 Hz), 5.575 (1H, dd, J=17.6 and 1.1 Hz), 5.048 (1H, dd, J=11.0 and 1.4 Hz).

实施例 15

用乙酸钾作碱性催化剂，在 DMF 中使对-羟基肉桂酸脱羧制备 4-羟基苯乙烯

该实施例的目的是在阻聚剂(100 ppm Prostab®5415)的存在下，用乙酸钾(3 mol%)作碱性催化剂，在 DMF 中通过热、碱催化使对-羟基肉桂酸脱羧，制备 4-羟基苯乙烯。

按实施例 14 中所述进行反应，不同之处在于使用 100 ppm Prostab®5415 (0.5 mg, 按 250 μL 2 mg/mL 的 DMF 溶液加入)和 3 mol% 乙酸钾(90 mg)。按实施例 14 中所述分离产物，得到 3.82 g 金黄色半固体(理论收率的 104.6%)。用 ¹H NMR 分析产物。

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ (ppm) 7.993 (0.22H, s), 7.275 (2H, ABq, J=8.6 Hz), 6.76 (2H, ABq, J=8.6 Hz), 6.65 (1H, dd, J=17.6 and 10.9 Hz), 5.577 (1H, dd, J=17.6 and 1.4 Hz), 5.048 (1H, dd, J=11.0 and 0.7 Hz).

实施例 16

在一个容器中反应使对-羟基肉桂酸脱羧, 随后乙酰化制备 4-乙酰氧基苯乙烯

该实施例的目的是按两步、一个容器反应的方法, 用热、碱催化使对-羟基肉桂酸脱羧, 随后用乙酸酐使得到的 4-羟基苯乙烯乙酰化, 制备 4-乙酰氧基苯乙烯。用 100 ppm 浓度的 Prostab®5415 作阻聚剂。

向 3 颈圆底烧瓶中加入 pHCA (5 g, 30.458 mmol, 1 当量)、30 ml DMF (以制成 1 M 的 pHCA 溶液)、100 ppm Prostab®5415 (0.5 mg, 以 250 μ L 2 mg/mL DMF 溶液加入)和乙酸钾(30 mg, 1 mol%)。在氮气下, 在搅拌、回流冷凝器回流下进行反应。用油浴和控温器(带超温保护)将反应物加热至 150 $^{\circ}$ C。乙酸钾在室温不溶, 但加热后溶解, 得到浅黄色溶液。同上述, 通过 TLC 监测反应。在 150 $^{\circ}$ C 下, 2 h 后, TLC 测定表明反应完全。然后, 将反应温度降至 140 $^{\circ}$ C, 将乙酸酐(4.32 mL, 45.687 mmol, 1.5 当量)滴加至反应混合物中, 将温度保持在 140 $^{\circ}$ C。反应混合物的颜色变浅。0.75 h 后, 根据 TLC 确定反应完全。停止加热, 使反应混合物冷却至室温。将反应混合物在 -20 $^{\circ}$ C 下存储过夜。

用实施例 14 中所述分离 4-羟基苯乙烯的方法分离 4-乙酰氧基苯乙烯, 得到 5.39 g 浅黄色、半固体(理论收率的 109%)。用 ^1H NMR 分析产物。得到大于产物理论收率的收率和产物性质(即浅黄色半固体)提示产物含某些杂质。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.40 (2H, ABq, $J=8.6$ Hz), 7.045 (2H, ABq, $J=8.5$ Hz), 6.693 (1H, dd, $J=17.5$ and 11.0 Hz), 5.693 (1H, dd, $J=17.6$ and 0.7 Hz), 5.234 (1H, dd, $J=10.9$ and 0.8 Hz), 2.29 (2.64H, s)

实施例 17

按一个容器反应法，使对-羟基肉桂酸脱羧，随后乙酰化制备 4-乙酰氧基苯乙烯

该实施例的目的是按两步、一个容器反应的方法，用热、碱催化使对-羟基肉桂酸脱羧，随后用乙酸酐使得到的 4-羟基苯乙烯乙酰化，制备 4-乙酰氧基苯乙烯。用 1000 ppm 浓度的 Prostab® 5415 作阻聚剂。

按实施例 16 中所述进行脱羧和乙酰化反应，不同之处在于用 1000 ppm Prostab® 5415 (5 mg)作阻聚剂。按实施例 16 中所述分离 4-乙酰氧基苯乙烯产物，得到 4.82 g 黄色油状物(理论收率的 97.5%)。用 ^1H NMR 分析产物。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.40 (2H, ABq, $J=8.4$ Hz), 7.04 (2H, ABq, $J=8.5$ Hz), 6.695 (1H, dd, $J=17.6$ and 11.0 Hz), 5.695 (1H, d, $J=17.6$ Hz), 5.235 (1H, d, $J=10.9$ Hz), 2.29 (3H, s)

实施例 18

按一个容器反应法，使 3,4-二羟基肉桂酸脱羧，随后乙酰化制备 3,4-二乙酰氧基苯乙烯

该实施例的目的是按两步、一个容器反应的方法，用热、碱催化使 3,4-二羟基肉桂酸脱羧，随后用乙酸酐使得到的 3,4-羟基苯乙烯乙酰化，制备 3,4-二乙酰氧基苯乙烯。用 1000 ppm 浓度的 Prostab®5415 作阻聚剂。

在氮气下，机械混合下，向 1L 3 颈圆底烧瓶中加入 0.5 g Prostab®5415、2.725 g 乙酸钾和 50.0 g 3,4-二羟基肉桂酸。然后加入 DMF (280 mL)，得到深棕色溶液。将该反应混合物加热至 100℃，用水冷凝器。通过取样和用 LC-MS 分析样品，定期检查反应进程。4.5 h 后，测得形成理论收率 96.6%的 3,4-二羟基苯乙烯中间体。再将反应物加热 45 min。然后，在 15 min 内，将 132.7 mL 乙酸酐加入反

应混合物。再将反应进行 15 min, 然后在 45 min 内, 将反应混合物冷却至室温。

将反应混合物倾入含约 400 mL 水的烧杯中, 然后用乙醚萃取三次。将这些萃取液的合并有机层用 2% NaHCO_3 溶液萃取三次, 然后用盐水萃取一次。有机层经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 在 40℃ 下, 在旋转蒸发仪上蒸发浓缩 1 h, 得到 95.2 g 深棕色油状物。将油状物在 -20℃ 下存储过夜。然后, 在 105-107℃ 下, 在 1.3 mPa 压力下, 用真空蒸馏将油状物蒸馏, 得到 45.11 g 透明粘性液体(理论收率的 79.1%)。通过 ^1H NMR 和 LC-MS 分析 3,4-二乙酰氧基苯乙烯产物, 表明纯度为 99.7%。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.26 (1H, dd, $J=8$ and 2 Hz), 7.22 (1H, d, $J=2$ Hz), 7.13 (1H, d, $J=9$ Hz), 6.65 (1H, dd, $J=18$ and 11 Hz), 5.68 (1H, dd, $J=18$ and 1 Hz), 5.26 (1H, d, $J=11$ Hz), 2.27 (3H, s), 2.26 (3H, s).

实施例 19

无阻聚剂存在时, 通过使对-羟基肉桂酸脱羧制备 4-羟基苯乙烯

该实施例的目的是无阻聚剂存在时, 用乙酸钾(1 mol%)作碱性催化剂, 在 DMAc 中通过热、碱催化使浓对-羟基肉桂酸(4 M 或 2.54 M)脱羧, 制备 4-羟基苯乙烯。

向 3 颈圆底烧瓶中加入 pHCA (20.035 g, 122.05 mmol)和 30.034 g DMAc (制成 2.54 M 的 pHCA 溶液)。将反应烧瓶置于预热至 150℃ 的油浴中, 约 15 min 后, 溶液达到温度。一次性加入乙酸钾(0.124 g, 1 mol%)。在氮气下, 在搅拌并用回流冷凝器回流下, 反应进行 8 h。在临加入乙酸钾前(0 时间)和在 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h 时取样, 用上述方法 2, 通过 HPLC 分析 pHCA 和 pHS。结果列于表 5, 结果表明 4 h 后, pHCA 转化基本完全, 此时, pHS 的收率为 87.1%。

表 5

在各时间点用 HPLC 测定的 pHCA 和 pHS 值

反应时间 (min)	pHCA (mmol)	pHS (mmol)
0	116.9	4.8
15	97.0	23.4
30	83.0	42.5
60	50.6	66.1
120	17.0	96.0
240	0.6	106.3
360	0	103.4
480	0	96.6

实施例 20-22

在 DMAc 中，用不同水平乙酸钾作碱性催化剂，使对-羟基肉桂酸脱羧制备 4-羟基苯乙烯

这些实施例的目的是用不同水平乙酸钾作碱性催化剂，在 DMAc 中通过热、碱催化使浓对-羟基肉桂酸(2.5 M)脱羧，制备 4-羟基苯乙烯。

在这些实施例中，使用与实施例 19 中所述相同的方法，不同之处在于加入反应溶液中的乙酸钾的量。向 3 颈圆底烧瓶中加入 pHCA (19.11 g, 116.4 mmol)和 30.0 g DMAc (制成 2.5 M 的 pHCA 溶液)。将反应烧瓶置于预热至 135℃的油浴中，约 15 min 后，溶液达到温度。一次性加入乙酸钾(用量列于表 6)。在氮气下，在搅拌、回流冷凝器回流下，反应进行 4 - 6 h。在临加入乙酸钾前(0 时间)和在 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h 和 6 h 时取样，用上述方法 2，通过 HPLC 分析 pHCA 和 pHS。对于无乙酸钾的对比实施例 22，以反应溶液的温度平衡至 135℃时的时间作为 0 时间。

表 6

用不同水平乙酸钾，在各反应时间点，HPLC 测定的
pHCA 和 pHS 值

	实施例 20		实施例 21		对比实施例 22	
乙酸钾	1.146 g (10 mol%)		2.860 g* (25 mol%)		0 (0 mol%)	
反应时间 (min)	pHCA (mmol)	pHS (mmol)	pHCA (mmol)	pHS (mmol)	pHCA (mmol)	pHS (mmol)
0	113.3	0	114.3	0	114.2	0
15	87.0	26.7	67.6	46.4	114.7	1.5
30	63.4	50.0	35.8	79.2	112.1	3.7
60	28.5	84.7	8.3	105.2	105.0	8.8
120	4.7	107.9	0.5	102.1	95.9	18.3
240	0	102.1	0	88.7	76.9	34.1
360	0	89.5	0	71.9	nd	nd

*在实施例 21 中，在 60 - 120 min 期间沉淀的固体，鉴定为乙酸钾。

由列于表 6 的结果可知，在实施例 20 中，2 h 后得到的 pHS 收率为 92.7%，在实施例 21 中，1 h 后得到的 pHS 收率为 90.4%。两个实施例均表明 pHCA 完全转化时间小于 4 h。相反，除无碱性催化剂外，按相同条件操作的对比实施例 22 表明甚至 4 h 后，pHS 收率仅为 29.3%，pHCA 的转化率仅为 33.9%。

实施例 23

用乙酸钾作碱性催化剂，在一缩二丙二醇甲醚中通过使对-羟基肉桂酸脱羧制备 4-羟基苯乙烯

该实施例的目的是用乙酸钾(10 mol%)作碱性催化剂，在质子溶剂一缩二丙二醇甲醚(Dowanol™ DPM; Dow Chemical Co., Midland, MI)中，通过热、碱催化使对-羟基肉桂酸脱羧(2.5 m)制备 4-羟基苯乙烯。

向 3 颈圆底烧瓶中加入 pHCA (12.318 g, 75.04 mmol)和 30.052 g 一缩二丙二醇甲醚(制成 2.5 m 的 pHCA 溶液)。将反应烧瓶置于预热至 135℃的油浴中，约 15 min 后，溶液达到温度。当溶液加热时，pHCA 完全溶解。立即全部加入乙酸钾(0.739 g, 10 mol%)。在氮气下，在搅拌、回流冷凝器回流下，反应进行 8 h。加入碱后形成固体，固体形成增多直至约 3 h 后停止，然后再经约 5 h，固体又完全溶解。在临加入乙酸钾前(0 时间)和在 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h 取样，用上述方法 2，通过 HPLC 分析 pHCA 和 pHS。结果(见表 7)表明，2 h 后 pHS 收率为 67.3%。延长反应时间降低收率。该结果证明质子溶剂可用于热脱羧反应。

表 7

用一缩二丙二醇甲醚作溶剂，在各反应时间点，HPLC 测定的 pHCA 和 pHS 值

反应时间 (min)	pHCA (mmol)	pHS (mmol)
0	73.5	0
15	60.6	12.0
30	46.2	21.9
60	31.6	38.0
120	12.3	50.5
240	2.2	45.9
360	0	17.7
480	0	7.2

实施例 24

用乙酸钾作碱性催化剂，在 DMF 中用微波加热，通过使对-羟基肉桂酸脱羧制备 4-羟基苯乙烯

该实施例的目的是在阻聚剂(1000 ppm Prostab®5415)的存在下，用乙酸钾作碱性催化剂，在 DMF 中通过热、碱催化使对-羟基肉桂酸脱羧制备 4-羟基苯乙烯。该实施例利用微波加热，导致温度较高和反应时间较短。

向配备搅拌棒的 5 mL Biotage 试管瓶(Biotage AB, Charlottesville, VA)中加入 pHCA (1.002 g, 6.104 mmol)、3 mL DMF (以制成药 2 M 的 pHCA 溶液)、1000 ppm Prostab®5415 (1 mg)和乙酸钾(63 mg, 10 mol%)。将氮气吹入试管，迅速将试管加盖压紧。将密闭瓶置于 Biotage Initiator 60 微波反应器(Biotage AB)中。在中等功率 150 瓦特下，经 70-80 秒升温期后，样品温度达到 190℃。将样品在 190℃下保持 3 min，有一段较短时间温度升至约 200℃。在运行期间，样品压力达到 16 巴(1600 kPa)。用上述方法 3 对暴露样品进行定量 HPLC 分析，表明 pHCA 完全转化；在 220 -312 nm UV 光谱范围内未检出 pHCA。在 220 nm 处，pHS 峰面积为 73.3%，在 312 nm 处，峰面积为 100%，表明该反应的选择性好。

实施例 25

按一个容器反应法，使对-羟基肉桂酸脱羧，随后乙酰化制备 4-乙酰氧基苯乙烯

该实施例的目的是按两步、一个容器反应的方法，用热、碱催化使对-羟基肉桂酸脱羧，随后用乙酸酐使得到的 4-羟基苯乙烯乙酰化，制备 4-乙酰氧基苯乙烯。该实施例不使用阻聚剂，由酪氨酸生物转化衍生的 pHCA 原料纯度为约 85%。

用类似于 Ben Bassat 等在共同待审和共同拥有的美国专利申请号 60/563633 中所述的方法，制备 pHCA 原料。该方法涉及由葡萄糖制备 pHCA 的两阶段方法。在该实施例使用的方法中，按两个独立的步骤进行这两个阶段。第一步，通过用酪氨酸超量产生菌株发酵，由葡萄糖制备酪氨酸。用低速离心将酪氨酸与发酵液分离。将得到的沉淀悬浮于水中，再用低速离心分离。用 HPLC 估计酪氨酸的纯度为 90-98%。然后，在第二阶段中，在 pH 10.0，用含具有酪氨酸脱氨酶活性的酶的宿主细胞将酪氨酸转化为 pHCA。pHCA 在发酵培养液中聚集。将约 7.5 kg 含 pHCA 的发酵液离心，弃去固体。将上清液转移至 14 L Braun 发酵罐，BioStat C.B. (Braun Biotech International, Melesungen, Germany)，在 35℃ 和 600 rpm 下操作。用硫酸将溶液的 pH 调至 9.0。然后，加入 0.254 ml Alcalase® (Novozymes, Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, Denmark) 和 0.134 g Bromelain (Acros Organics, 得自 Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)。经 1 h 温育后，将溶液滴定至 pH 2.2，使 pHCA 沉淀。将得到的悬浮液离心，回收 pHCA，为含约 40% 固体的 600 g 湿饼。除 pHCA 外，该湿饼还含蛋白质、细胞碎片、盐、约 0.21% 肉桂酸和 0.1% 酪氨酸。在氮气下，将湿饼在 80℃ 下干燥 12 h，得到含约 85% pHCA 的干饼。

通过如下提取方法纯化生物制备的 pHCA。向 1 L 罐中加入 163.88 g 含 pHCA 的干饼。向该罐中加入 350 ml DMAc，在机械搅拌下，

将内容物加热至 60℃，保持 2 h。使混合物通过 Whatmann 4 号滤纸过滤，将不溶物用 50 ml DMAc 洗涤。

将合并的滤液和提取物的洗液加入配备顶式搅拌器、回流冷凝器、加料漏斗和温度探头的 1 L 4 颈烧瓶中。通过上述 HPLC 方法 4 分析反应混合物，表明含 122.98 g pHCA。向该混合物中加入 8.8 g (10 mol%) 乙酸钾，在氮气下，将混合物加热至 135℃，保持 3 h。在 8 min 内，通过加料漏斗加入乙酸酐(91.77 g, 84.97 ml)。再将反应混合物搅拌 0.5 h，然后冷却至室温。在 65℃下，在 2.8 托(0.37 kPa)下，将溶剂在旋转蒸发仪上除去。将固体从混合物中分离并用 whatmann 4 号滤纸滤出。将固体用 30 ml DMAc 洗涤。在 2.5 托(0.33 kPa)和 65℃下，将合并的滤液在旋转蒸发仪上进一步浓缩，直至无溶剂蒸出。

加入 200 ppm 甲基氢醌将由此得到的 157.5 g 粗 pAS 稳定，在薄膜蒸发仪(KDL-4 型，表面积 0.04 m²，来自 UIC Inc. 1225 Channahon Rd., Joliet, IL 60436)上蒸馏。蒸馏在 2.00 mm Hg (0.267 kPa)下进行，加料速度 2.0 mL/min，搅拌速度 300 rpm。进口温度 71℃，出口温度 70℃，将冷手试模(coldfinger)温度保持在 10℃。塔顶的 pAS 以及残留 DMAc 为 112.9 g，重部分(27.6 g)含 pAS 及其在最后蒸馏期间形成的低聚物。通过在 0.02 托(2.7 Pa)和在 45℃下蒸馏，将 DMAc 从塔顶部分除去，得到 86.2 g (71%收率) pAS。