

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6480731号
(P6480731)

(45) 発行日 平成31年3月13日 (2019. 3. 13)

(24) 登録日 平成31年2月15日 (2019. 2. 15)

(51) Int. Cl. F 1
A 2 4 B 15/26 (2006. 01) A 2 4 B 15/26
A 2 4 B 13/00 (2006. 01) A 2 4 B 13/00

請求項の数 15 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2014-508509 (P2014-508509)	(73) 特許権者	594112886
(86) (22) 出願日	平成24年4月25日 (2012. 4. 25)		アール・ジエイ・レイノルズ・タバコ・カンパニー
(65) 公表番号	特表2014-512825 (P2014-512825A)		アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27102、ウインストン・セイレム、ノース・メイン・ストリート・401
(43) 公表日	平成26年5月29日 (2014. 5. 29)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/034961	(74) 代理人	110001173
(87) 国際公開番号	W02012/148996		特許業務法人川口国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成24年11月1日 (2012. 11. 1)	(72) 発明者	バード、クリスタル・ダウン・ヘツジ
審査請求日	平成27年4月21日 (2015. 4. 21)		アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27295、レキシントン、ジョージ・ヘツジ・ロード・603
審査番号	不服2017-12025 (P2017-12025/J1)		
審査請求日	平成29年8月10日 (2017. 8. 10)		
(31) 優先権主張番号	13/095, 277		
(32) 優先日	平成23年4月27日 (2011. 4. 27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タバコに由来する成分及び物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

風味物質として有用な *Nicotiana* 種の植物からの分解産物を提供する方法であって、

Nicotiana 種の植物物質を受け取ることと、

植物物質から1以上の所望の化合物を溶媒に抽出するのに十分な時間及び条件下で植物物質を溶媒に接触させることと、

抽出した植物物質から1以上の所望の化合物を含有する溶媒を分離すること、

1以上の所望の化合物を含有する溶媒を精製して少なくとも75重量パーセントの1以上の所望の化合物を含む単離物を提供することと、

単離物を処理してそれから1以上の分解産物を提供することを含み、

1以上の所望の化合物が、ソラノン、ネオフィタジエン、メガスティグマトリエノン、
 - ダマセノン、ノルソラナジオン、シス - アビエノール、
 - センプラトリエンジオール、
 - センプラトリエンジオール、ルテイン、及びそれらの混合物から成る群から選択され、

単離物を処理することが酸化、熱処理及びそれらの組み合わせから選択される方法。

【請求項2】

Nicotiana 種の植物物質が、葉全体、積層物、切断充填物、拡大した体積、葉柄、切断して巻いた葉柄、切断して膨らませた葉柄、再構成したタバコ、及び粒子状物質から成る群から選択される形態である請求項1の方法。

【請求項 3】

溶媒がメタノールである請求項 1 の方法。

【請求項 4】

1 以上の所望の化合物が、シス - アピエノール、 - センプラトリエンジオール、 - センプラトリエンジオール、及びルテインから成る群から選択される請求項 3 の方法。

【請求項 5】

溶媒が乾燥蒸気である請求項 1 の方法。

【請求項 6】

1 以上の所望の化合物が、ソラノン、ネオフィタジエン、メガスティグマトリエノン、 - ダマセノン、及びノルソラナジオンから成る群から選択される請求項 5 の方法。

10

【請求項 7】

接触工程がさらに蒸留物を回収することを含む請求項 5 の方法。

【請求項 8】

蒸留物が水性層及び油性層を含む請求項 7 の方法。

【請求項 9】

1 以上の所望の化合物を含有する溶媒が、油性層、水性層、及び蒸留工程から生成される廃棄蒸気から成る群から選択される請求項 8 の方法。

【請求項 10】

精製工程が分取用規模の液体クロマトグラフィ又はフラッシュクロマトグラフィを使用することを含む請求項 1 の方法。

20

【請求項 11】

精製工程が、90重量%を超える1以上の所望の化合物を含む単離物を提供する請求項 1 の方法。

【請求項 12】

精製工程が、95重量%を超える1以上の所望の化合物を含む単離物を提供する請求項 1 の方法。

【請求項 13】

単離物がルテインを含み、1以上の分解産物がメガスティグマトリエノン、 - ダマセノン及びそれらの混合物から成る群から選択される請求項 1 の方法。

【請求項 14】

単離物がシス - アピエノールを含み、1以上の分解産物がスクラレオリド、スクラレオール、アンプロキシド及びそれらの混合物から成る群から選択される請求項 1 の方法。

30

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれかの方法により提供される分解産物を、喫煙物品又は無煙タバコ組成物での使用に適合させたタバコ組成物に加えることを含むタバコ組成物を提供する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タバコから作製される又はタバコに由来する製品、又はそうでなければタバコを組み入れる及びヒトの消費を対象とする製品に関する。特に関心があるのは、Nicotiana種の植物又は植物の一部から得られる又は由来する成分又は構成成分である。

40

【背景技術】

【0002】

紙巻タバコのような人気がある喫煙物品は実質的に円筒状のロッド形状構造を有し、紙の包装紙によって取り囲まれ、それによっていわゆる「タバコロッド」を形成する、たとえば、刻みタバコのような喫煙可能物質の充填、巻物又は円筒物（切断したフィルター形態で）が含まれる。普通、紙巻タバコは、タバコロッドと端と端を接した関係で並ぶ円筒状のフィルター要素を有する。通常、フィルター要素は、「プラグラップ」として知られ

50

る紙材によって囲まれた可塑化セルロースアセテートのトウを含む。特定の紙巻タバコは複数の区分を有するフィルター要素を組み入れ、それら区分の1つは活性炭粒子を含むことができる。通常、フィルター要素は「チップペーパー」として知られる外接する包装材料を用いてタバコロッドの一端に取り付けられる。引き込まれた主流煙を周囲の空気希釈することを提供するために、チップ材及びプラグラップに穴を開けることも望ましくなっている。その一端に火をつけ、タバコロッドを燃やすことによって紙巻タバコは喫煙者によって使用される。次いで喫煙者は、紙巻タバコの対向する端（たとえば、フィルター端）を利用することによってその口の中へ主流煙を受け取る。

【0003】

紙巻タバコに使用されるタバコは通常、混合された形態で使用される。たとえば、特定の人気のあるタバコのブレンドは、一般に「アメリカンブレンド」と呼ばれ、鉄管乾燥タバコ、パーレー種タバコ及びオリエンタルタバコ、並びに多くの場合、特定の加工したタバコ、たとえば、再構成したタバコ及び加工したタバコの葉柄の混合物を含む。特定の紙巻タバコの銘柄の製造に使用されるタバコのブレンドの中での各種のタバコの正確な量は銘柄によって異なる。しかしながら、タバコのブレンドの多くについては、鉄管乾燥タバコがブレンドの相対的に大きな比率を構成する一方で、オリエンタルタバコはブレンドの相対的に小さな比率を構成する。たとえば、Tobacco Encyclopedia, Voges (編) p. 44 - 45 (1984), Browne, The Design of Cigarettes, 3rd Ed., p. 43 (1990) 及び Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davisら (編) p. 346 (1999) を参照のこと。

【0004】

タバコは、いわゆる「無煙」形態でも楽しまれ得る。特に人気のある無煙タバコ製品は、ある形態の加工したタバコ又はタバコを含有する製剤を使用者の口に挿入することによって使用される。様々な種類の無煙タバコ製品が、Schwartzへの米国特許第1,376,586号; Leviへの同第3,696,917号; Pittmanらへの同第4,513,756号; Sensabaugh, Jr.らへの同第4,528,993号; Storyらへの同第4,624,269号; Townsendへの同第4,987,907号; Sprinkle, IIIらへの同第5,092,352号; 及びWhiteらへの同第5,387,416号; Stricklandらへの米国特許出願公開番号2005/0244521及びKumarらへの同2009/0293889; ArnarpらへのPCT WO04/095959; AtchleyらへのPCT WO05/063060; EngstromへのPCT WO05/004480; BjorkholmへのPCT WO05/016036; 及びQuinterらへのPCT WO05/041699にて言及されており、そのそれぞれが参照によって本明細書に組み入れられる。たとえば、そのそれぞれが参照によって本明細書に組み入れられるAtchleyらへの米国特許第6,953,040号及びAtchleyらへの同第7,032,601号にて言及された無煙タバコ製剤、成分及び加工方法を参照のこと。

【0005】

無煙タバコ製品の種類の1つは、「嗅ぎ薬」と呼ばれる。湿り気のある嗅ぎ薬製品の代表的な種類は、一般に嗅ぎタバコ(スヌース)と呼ばれ、たとえば、Swedish Match AB、Fiedler & Lundgren AB、Gustavus AB、Skandinavisk Tobaks-kompagni A/S及びRocke r Production ABのような会社によって又は会社を介してヨーロッパ、特にスウェーデンで製造されている。米国で入手可能な嗅ぎタバコ製品は、R.J. Reynolds Tobacco Companyによる商標、キャメルスヌースフロスト、キャメルスヌースオリジナル及びキャメルスヌーススパイスのもとで市販されている。たとえば、Bryzgalovら、1N1800 Life Cycle Assessment, Comparative Life Cycle Assessment of General Loose and Portion Snus (2005) も参照

10

20

30

40

50

のこと。加えて、嗅ぎタバコ製造に関連する特定の品質基準は、いわゆるG o t h i a T e k基準としてまとめられている。代表的な無煙タバコ製品は商標、House of Oliver Twist A/Sによるオリバーツイスト；米国Smokeless Tobacco社によるコペンハーゲン、スコール、スコールドライ、ロースター、レッドシール、ハスキー、及びレベル；米国Philip Morrisによる「タバカ」；Conwood社によるレビ・ガレット(Levi Garrett)、ピーチー(Peachy)、テイラーズプライド(Taylor's Pride)、コディアック(Kodia)、ハウケン・ウインターグリーン(Hawken Wintergreen)、グリズリー(Grizzly)、デンタル(Dental)、ケンタッキーキング(Kentucky King)及びLLC社によるマンモスケープ(Mammoth Cave)；及びキャメルオーブス(Camel Orbs)、キャメルスティック(Camel Sticks)、並びにR. J. Reynolds Tobacco社によるキャメルストライプ(Camel Strips)のもとで市販されている。

10

【0006】

長年の間、タバコ製品で利用されるタバコ材料の全体的な特徴及び性質を変えるために様々な処理方法及び添加剤が提案されてきた。たとえば、タバコ材料の化学特性又は感覚特性を変えるために、喫煙可能なタバコ材料の場合、タバコ材料を含む喫煙物品によって生成される主流煙の化学特性又は感覚特性を変えるために、添加剤又は処理方法が利用されている。紙巻タバコの種々の成分に風味物質を組み込むことによって紙巻タバコの煙の感覚的な特質を高めることができる。例となる風味添加剤には、メントール及びメイラード反応の生成物、たとえば、ピラジン、アミノ糖、及びアマドリ化合物が挙げられる。参照によって本明細書に組み入れられるLeffingwellら、Tobacco Flavoring for Smoking Products, R. J. Reynolds Tobacco Company(1972)も参照のこと。場合によっては、熱の使用を含む処理工程は、加工したタバコに所望の色又は視覚的特徴、所望の感覚特性、又は所望の物理的な性質又は質感を付与することができる。タバコ組成物で使用するための風味豊かな及び芳香性の組成物を調製するための種々の工程は、Rookerへの米国特許第3,424,171号；Luttichへの同第3,476,118号；Osborne, Jr.らへの同第4,150,677号；Robertsonらへの同第4,986,286号；Whiteらへの同第5,074,319号；Whiteらへの同第5,099,862号；Sensabaugh, Jr.への同第5,235,992号；Raymondらへの同第5,301,694号；Coleman, IIIらへの同第6,298,858号；Coleman, IIIらへの同第6,325,860号；Coleman, IIIへの同第6,428,624号；Dubeらへの同第6,440,223号；Coleman, IIIへの同第6,499,489号；及びWhiteらへの同第6,591,841号；Coleman, IIIへの米国特許出願公開番号2004/0173228及びColeman, IIIらへの同2010/0037903にて言及されており、そのそれぞれが、参照によって本明細書に組み入れられる。

20

30

【0007】

特定の風味物質を組み入れることによって無煙タバコの感覚的な特質を高めることもできる。たとえば、そのそれぞれが、参照によって本明細書に組み入れられるWilliamsへの米国特許出願公開番号2002/0162562；Williamsへの同2002/0162563；Atchleyらへの同2003/0070687；Williamsへの同2004/0020503，Breslinらへの同2005/0178398；Stricklandらへの同2006/0191548；Holton, Jr.らへの同2007/0062549；Holton, Jr.らへの同2007/0186941；Stricklandらへの同2007/0186942；Dubeらへの同2008/0029110；Robinsonらへの同2008/0029116；Muraらへの同2008/0029117；Robinsonらへの同2008/0173317；及びNeilsonらへの同2008/0209586を参照のこと。

40

50

【 0 0 0 8 】

所望の特徴を導入するために喫煙製品又は無煙タバコ製品に添加するのに好適な風味豊かな組成物に対するニーズが当該技術に存在する。そのような組成物の効率的な抽出及び単離のための方法を提供することが望ましい。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 9 】

- 【 特許文献 1 】 米国特許第 1 , 3 7 6 , 5 8 6 号明細書
- 【 特許文献 2 】 米国特許第 3 , 6 9 6 , 9 1 7 号明細書
- 【 特許文献 3 】 米国特許第 4 , 5 1 3 , 7 5 6 号明細書 10
- 【 特許文献 4 】 米国特許第 4 , 5 2 8 , 9 9 3 号明細書
- 【 特許文献 5 】 米国特許第 4 , 6 2 4 , 2 6 9 号明細書
- 【 特許文献 6 】 米国特許第 4 , 9 8 7 , 9 0 7 号明細書
- 【 特許文献 7 】 米国特許第 5 , 0 9 2 , 3 5 2 号明細書
- 【 特許文献 8 】 米国特許第 5 , 3 8 7 , 4 1 6 号明細書
- 【 特許文献 9 】 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 4 4 5 2 1 号明細書
- 【 特許文献 1 0 】 米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 2 9 3 8 8 9 号明細書
- 【 特許文献 1 1 】 国際公開第 2 0 0 4 / 0 9 5 9 5 9 号
- 【 特許文献 1 2 】 国際公開第 2 0 0 5 / 0 6 3 0 6 0 号
- 【 特許文献 1 3 】 国際公開第 2 0 0 5 / 0 0 4 4 8 0 号 20
- 【 特許文献 1 4 】 国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 6 0 3 6 号
- 【 特許文献 1 5 】 国際公開第 2 0 0 5 / 0 4 1 6 9 9 号
- 【 特許文献 1 6 】 米国特許第 6 , 9 5 3 , 0 4 0 号明細書
- 【 特許文献 1 7 】 米国特許第 7 , 0 3 2 , 6 0 1 号明細書
- 【 特許文献 1 8 】 米国特許第 3 , 4 2 4 , 1 7 1 号明細書
- 【 特許文献 1 9 】 米国特許第 3 , 4 7 6 , 1 1 8 号明細書
- 【 特許文献 2 0 】 米国特許第 4 , 1 5 0 , 6 7 7 号明細書
- 【 特許文献 2 1 】 米国特許第 4 , 9 8 6 , 2 8 6 号明細書
- 【 特許文献 2 2 】 米国特許第 5 , 0 7 4 , 3 1 9 号明細書
- 【 特許文献 2 3 】 米国特許第 5 , 0 9 9 , 8 6 2 号明細書 30
- 【 特許文献 2 4 】 米国特許第 5 , 2 3 5 , 9 9 2 号明細書
- 【 特許文献 2 5 】 米国特許第 5 , 3 0 1 , 6 9 4 号明細書
- 【 特許文献 2 6 】 米国特許第 6 , 2 9 8 , 8 5 8 号明細書
- 【 特許文献 2 7 】 米国特許第 6 , 3 2 5 , 8 6 0 号明細書
- 【 特許文献 2 8 】 米国特許第 6 , 4 2 8 , 6 2 4 号明細書
- 【 特許文献 2 9 】 米国特許第 6 , 4 4 0 , 2 2 3 号明細書
- 【 特許文献 3 0 】 米国特許第 6 , 4 9 9 , 4 8 9 号明細書
- 【 特許文献 3 1 】 米国特許第 6 , 5 9 1 , 8 4 1 号明細書
- 【 特許文献 3 2 】 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 7 3 2 2 8 号明細書
- 【 特許文献 3 3 】 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 3 7 9 0 3 号明細書 40
- 【 特許文献 3 4 】 米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 1 6 2 5 6 2 号明細書
- 【 特許文献 3 5 】 米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 1 6 2 5 6 3 号明細書
- 【 特許文献 3 6 】 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 7 0 6 8 7 号明細書
- 【 特許文献 3 7 】 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 2 0 5 0 3 号明細書
- 【 特許文献 3 8 】 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 7 8 3 9 8 号明細書
- 【 特許文献 3 9 】 米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 9 1 5 4 8 号明細書
- 【 特許文献 4 0 】 米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 6 2 5 4 9 号明細書
- 【 特許文献 4 1 】 米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 8 6 9 4 1 号明細書
- 【 特許文献 4 2 】 米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 8 6 9 4 2 号明細書
- 【 特許文献 4 3 】 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 9 1 1 0 号明細書 50

【特許文献44】米国特許出願公開第2008/0029116号明細書

【特許文献45】米国特許出願公開第2008/0029117号明細書

【特許文献46】米国特許出願公開第2008/0173317号明細書

【特許文献47】米国特許出願公開第2008/0209586号明細書

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Tobacco Encyclopedia, Voges (編) p. 44 - 45 (1984)

【非特許文献1】Browne, The Design of Cigarettes, 3rd Ed., p. 43 (1990)

10

【非特許文献2】Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davisら (編) p. 346 (1999)

【非特許文献3】Bryzgalovら、1N1800 Life Cycle Assessment, Comparative Life Cycle Assessment of General Loose and Portion Snus (2005)

【非特許文献4】Leffingwellら、Tobacco Flavoring for Smoking Products, R. J. Reynolds Tobacco Company (1972)

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、Nicotiana種の植物に由来する種々の化合物を抽出し、単離する方法を提供する。本発明の方法は、喫煙物品及び/又は無煙タバコ製品に風味豊かな特徴を付与する特定の化合物、及び/又は風味豊かな特徴を付与する化合物を生成するように分解する化合物について選択的である。本発明はまた、これらの化合物及びこれらの化合物を組み入れるタバコ材料を加工する方法も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

従って、態様の1つでは、本発明は、Nicotiana種の植物に由来する化合物を抽出し、単離する方法を提供する。特定の実施形態では、方法は、Nicotiana種の植物物質を受け取ることと、植物物質から溶媒に1以上の所望の化合物を抽出するのに十分な時間及び条件下で植物物質を溶媒に接触させることと、抽出された植物物質から1以上の所望の化合物を含有する溶媒を分離することと、1以上の所望の化合物を含有する溶媒を精製して単離物を提供することを含む。一部の実施形態では、こうして得られた単離物は少なくとも75重量パーセントの1以上の所望の化合物を含む。特定の実施形態では、1以上の所望の化合物は、ソラノン、ネオフィタジエン、メガスティグマトリエノン、 α -ダマセノン、ノルソラナジオン、シス-アピエノール、 β -センブラトリエンジオール、 α -センブラトリエンジオール、スクロースエステル、ルテイン、それらの分解産物、及びそれらの混合物から成る群から選択される。本発明は、単一化合物又は分解産物又は2以上の化合物の群又は上記リストの分解産物を含有する単離物を含む。

30

40

【0013】

一部の実施形態では、Nicotiana種の植物物質は、葉全体、積層物、切断充填物、拡大した体積、葉柄、切断して巻いた葉柄、切断して膨らませた葉柄、再構成したタバコ、及び粒子状物質から成る群から選択される形態である。一部の実施形態では、Nicotiana種の植物物質は、緑葉形態又は乾燥した形態で提供される。

【0014】

特定の実施形態では、溶媒はメタノールである。こうして得られる1以上の所望の化合物は、たとえば、シス-アピエノール、 β -センブラトリエンジオール、 α -センブラトリエンジオール、スクロースエステル及びルテインから成る群から選択することができる

50

。特定の実施形態では、溶媒は乾燥蒸気である。こうして得られる1以上の所望の化合物は、たとえば、ソラノン、ネオフィタジエン、メガスティグマトリエノン、 α -ダマセノン、及びノルソラナジオンから成る群から選択することができる。溶媒が乾燥蒸気である場合、接触工程はさらに蒸留物を回収することを含む。一部の実施形態では、蒸留物は水性層と油性層を含むことができ、1以上の所望の化合物を含有する溶媒は油性層、水性層、及び蒸留工程から生成される廃棄蒸気から成る群から選択することができる。

【0015】

一部の実施形態では、精製工程は、分取用規模の液体クロマトグラフィを使用することを含む。特定の実施形態では、精製工程はフラッシュクロマトグラフィを使用することを含む。精製工程は、所望のレベルの1以上の所望の化合物、たとえば、約90重量%を超える又は95重量%を超える1以上の所望の化合物を伴った単離物を提供することができる。特定の実施形態では、方法はさらに喫煙物品又は無煙タバコ組成物における使用に適合したタバコ組成物に単離物を加えることを含む。

10

【0016】

一部の実施形態では、単離物をさらに処理してそれからの1以上の分解産物を提供することができる。処理することは酸化（すなわち、 H_2O_2 又は別の酸化試薬で処理すること）及び/又は熱処理を含む。一例として、単離物は、ルテインを含むことができ、1以上の分解産物は、メガスティグマトリエノン、 α -ダマセノン及びそれらの混合物から成る群から選択することができる。別の例として、単離物はシス-アビエノールを含むことができ、1以上の分解産物は、スクラレオリド、スクラレオール、アンブロキシド及びそれらの混合物から成る群から選択することができる。

20

【0017】

本発明の別の態様では、タバコ組成物に添加するために、*Nicotiana*種の植物に由来する風味物質を提供する方法が提供され、方法は、*Nicotiana*種の植物物質を受け取ることと、植物物質から溶媒に1以上の所望の化合物を抽出するのに十分な時間及び条件下で植物物質を溶媒に接触させることと、抽出された植物物質から1以上の所望の化合物を含有する溶媒を分離することと、1以上の所望の化合物を含有する溶媒を精製して、少なくとも約75重量%の1以上の所望の化合物を含む単離物を提供することと、喫煙物品又は無煙タバコ組成物における使用に適合したタバコ組成物に単離物を加えることとを含む、1以上の所望の化合物は、ソラノン、ネオフィタジエン、メガスティグマトリエノン、 α -ダマセノン、ノルソラナジオン、シス-アビエノール、 β -センブラトリエンジオール、 α -センブラトリエンジオール、スクロースエステル、ルテイン、それらの分解産物、及びそれらの混合物から成る群から選択される。

30

【0018】

化合物を抽出し、単離する方法について上記で言及したように、風味物質を提供する方法に対して種々の改変を行うことができる。たとえば、使用する植物物質及び溶媒を変えることができ、本発明の方法と組み合わせる種々の追加の処理方法を使用することができる。

【0019】

様々な方法で単離物をタバコ組成物に加えることができる。たとえば、タバコ細長片に適用される外包配合組成若しくは先端装飾配合組成の形態で、又は再構成されたタバコ材料の成分の形態で単離物を加えることができる。特定の実施形態では、タバコ組成物は喫煙物品での使用に適合したタバコ材料を含む。そのような実施形態では、タバコ組成物における単離物の量は、たとえば、喫煙物品におけるタバコ材料の総乾燥重量に基づいて約5ppm~約5重量パーセントの間であることができる。特定の実施形態では、タバコ組成物は無煙タバコ製品での使用に適合したタバコ材料を含む。そのような実施形態では、タバコ組成物における単離物の量は、たとえば、無煙タバコ製品におけるタバコ材料の総乾燥重量に基づいて約5ppm~約5重量パーセントの間であることができる。

40

【0020】

本発明の別の態様では、*Nicotiana*種の植物又はその成分に由来する単離物が

50

提供され、単離物は、少なくとも約75重量パーセントのソラノン、ネオフィタジエン、メガスティグマトリエノン、*β*-ダマセノン、ノルソラナジオン、シス-アピエノール、*β*-センブラトリエンジオール、*α*-センブラトリエンジオール、スクロースエステル、ルテイン、それらの分解産物、及びそれらの混合物から成る群から選択される化合物を含む。一部の実施形態では、単離物は約90重量%を超える又は95重量%を超える1以上の所望の化合物を含む。一部の実施形態では、喫煙物品又は無煙タバコ組成物での使用のための単離物を含むタバコ組成物が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0021】

今や下文にて本発明をさらに完全に説明する。しかしながら、本発明は多数の様々な形態で具現化されてもよく、本明細書で言及される実施形態に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、これら実施形態は、詳細且つ完全であり、本発明の範囲を当業者に完全に伝えるであろう。本明細書及び特許請求の範囲で使用されるとき、単数形態「a」、「an」及び「the」は文脈が明瞭に言及しない限り、複数の指示対象を含む。「乾燥重量パーセント」又は「乾燥重量ベース」に対する参照は乾燥成分（すなわち、水を除く成分すべて）に基づく重量を指す。

【0022】

Nicotiana 種に由来する植物の選択は様々であることができ；特にタバコ（単数）又はタバコ（複数）の種類は様々であることができる。採用することができるタバコには、鉄管乾燥又はバージニア（たとえば、K326）、パーレー、日干し（たとえば、カテリニ、プレリップ、コモチニ、キサランチ及びヤンポールタバコを含むインディアンクノール及びオリエンタルタバコ）、メリーランド、暗色、暗色火干し、暗色気干し（たとえば、パサンダ、クバノ、ジャティン及びベズキタバコ）、明色気干し（たとえば、ノースウィスコンシン及びガルパオタバコ）、インディアン気干し、レッドロシア及び *Rustica* タバコ、並びに他の稀な又は特殊なタバコが挙げられる。経験を成長させ、経験を収穫する様々な種類のタバコの記載は、参照によって本明細書に組み入れられる *Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis* ら（編）（1999）にて言及されている。*Nicotiana* 種に由来する種々の代表的な種類の植物は、それぞれ参照によって本明細書に組み入れられる *Goodspeed, The Genus Nicotiana, (Chonica Botanica)*（1954）；*Sensabaugh, Jr.* らへの米国特許第4,660,577号；*White* らへの同第5,387,416号及び *Lawson* らへの同第7,025,066号；*Lawrence, Jr.* への米国特許出願公開番号2006/0037623及び *Marshall* らへの同2008/0245377にて言及されている。例となる *Nicotiana* 種には、*N. tabacum*、*N. rustica*、*N. alata*、*N. arentsii*、*N. excelsior*、*N. forgetiana*、*N. glauca*、*N. glutinosa*、*N. gossei*、*N. kawakamii*、*N. knightiana*、*N. langsdorffii*、*N. otophora*、*N. setchelli*、*N. sylvestris*、*N. tomentosa*、*N. tomentosiformis*、*N. undulata*、*N. xanderiae*、*N. africana*、*N. amplexicaulis*、*N. benavidesii*、*N. bonariensis*、*N. debneyi*、*N. longiflora*、*N. maritima*、*N. megalosiphon*、*N. occidentalis*、*N. paniculata*、*N. plumbaginifolia*、*N. raimondii*、*N. rosulata*、*N. simulans*、*N. stocktonii*、*N. suaveolens*、*N. umbratica*、*N. velutina*、*N. wiganidioides*、*N. acaulis*、*N. acuminata*、*N. attenuata*、*N. benthamiana*、*N. cavicola*、*N. clevelandii*、*N. cordifolia*、*N. corymbosa*、*N. fragrans*、*N. goodspeedii*、*N. linearis*、*N. miersii*、*N. nudica*

10

20

30

40

50

ulis、N. obtusifolia、N. occidentalis subsp. Hersperis、N. pauciflora、N. petunioides、N. quadrivalvis、N. repanda、N. rotundifolia、N. solanifolia及びN. spegazziniiが挙げられる。

【0023】

遺伝子操作又は交配技術を用いてNicotiana種を導き出すことができる(たとえば、タバコ植物体を遺伝的に操作して又は交配して成分の生産、特徴又は特質を減らしたり、増やしたりすることができる)。たとえば、Fitzmauriceらへの米国特許第5,539,093号;Wahabらへの同第5,668,295号;Fitzmauriceらへの同第5,705,624号;Weiglへの同第5,844,119号;Dominguezらへの同第6,730,832号;Liuらへの同第7,173,170号;Colliverらへの同第7,208,659号及びBenningらへの同第7,230,160号;Conklingらへの米国特許出願公開番号2006/0236434及びNielsenらへのPCT WO2008/103935にて言及された植物の遺伝子操作の種類を参照のこと。

10

【0024】

無煙の又は喫煙可能なタバコ製品を調製するために、Nicotiana種の収穫された植物を乾燥工程に供することが典型的である。種々の種類のタバコの種類の種類乾燥工程の記載は、Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davisら(編)(1999)にて言及されている。鉄管乾燥タバコを乾燥する例となる技法及び条件は、参照によって本明細書に組み入れられるNestorら、Beitrag Tabakforsch. Int., 20, 467-475(2003)及びPeelieへの米国特許第6,895,974号にて言及されている。タバコを空気乾燥する代表的な技法及び条件は、参照によって本明細書に組み入れられるRotonら、Beitrag Tabakforsch. Int., 21, 305-320(2005)及びStaaflら、Beitrag Tabakforsch. Int., 21, 321-330(2005)にて言及されている。特定の種類のタバコは、たとえば、火干し又は日干しのような代替りの種類の乾燥工程に供することができる。好ましくは、乾燥させる収穫したタバコは次いで熟成させる。

20

【0025】

Nicotiana種の植物の少なくとも一部(たとえば、タバコ部分の少なくとも一部)は未成熟の形態で使用することができる。すなわち、植物又はその植物の少なくとも一部は通常完熟又は成熟とみなされる段階に達する前に収穫することができる。そのようなものとして、たとえば、タバコ植物体が発芽する時点で、葉の形成を開始するころ、開花するころ等にタバコを収穫することができる。Nicotiana種の植物の少なくとも一部(たとえば、タバコ部分の少なくとも一部)は成熟形態で使用することができる。すなわち、植物(又は植物の一部)が従来、完熟、過熟又は成熟であるとみなされる時点で達すると植物又はその植物の少なくとも一部を収穫することができる。そのようなものとして、たとえば、農夫によって従来採用されたタバコの収穫技術の使用を介して、オリエンタルタバコ植物体を収穫することができ、パーレータバコ植物体を収穫することができ、又はバージニアタバコの葉を収穫することができ、又は茎の位置で収穫することができる。

30

40

【0026】

本発明によれば、タバコ製品は、緑葉形態又は乾燥形態でNicotiana種の植物から抽出された及び/又は単離された1以上の化合物と組み合わせられるタバコを組み入れる。タバコ製品の少なくとも一部は、Nicotiana植物体から(たとえば、抽出、蒸留又は他の加工法によって)取り出された化合物を含むことができる。一部の実施形態では、タバコ製品の少なくとも一部は、これらの化合物に由来する分解産物、たとえば、植物を化学反応(たとえば、酸/塩基反応条件、酸化条件、酵素処理及び/又は熱処理)に供した後、又はNicotiana植物体から単離された化合物若しくはその混合物

50

を化学反応に供した後、回収される化合物で構成され得る。

【0027】

その中に存在する種々の化合物の内容について *Nicotiana* 種を選択することができる。たとえば、それらの植物がそれから単離されることが望ましい1以上の化合物を相対的に多量で生産することに基づいて植物を選択することができる。特定の実施形態では、*Nicotiana* 種の植物（たとえば、*Galpaocommuna* タバコ）は、豊富な葉表面の化合物について特に生育させられる。タバコ植物は温室、生育室にて又は畑にて戸外で、又は水耕栽培で生育させることができる。

【0028】

Nicotiana 種の植物の種々の部分又は一部を使用することができる。たとえば、10
、實際上、植物全体（たとえば、全植物）を収穫して、そのまま使用することができる。或いは、植物の種々の部分又は小片を収穫し、収穫後、さらなる使用のために分離することができる。たとえば、葉、葉柄、茎及びそれらの種々の組み合わせをさらなる使用又は処理のために単離することができる。従って本発明に植物物質は、*Nicotiana* 種の植物全体又は植物の一部を含み得る。

【0029】

植物又はその一部の収穫後の加工は様々であることができる。収穫後、植物又はその一部を緑葉形態で使用することができる（たとえば、植物又はその一部を乾燥工程に供することなく使用することができる）。たとえば、植物又はその一部を十分な保存、取扱い又は加工の条件に供することなく使用することができる。特定の状況では、植物又はその一部は20
実際、収穫直後に使用することが好ましい。或いは、たとえば、緑葉形態の植物又はその一部を後の使用のために冷蔵する又は冷凍する、凍結乾燥する、放射線に供する、黄色化する、乾かす、乾燥させる（たとえば、あぶる、揚げる、茹でる）、又はさもなければ、後の使用のために保存若しくは処理に供することができる。収穫された植物又はその一部を物理的に加工することができる。植物又はその一部を個々の部分又は小片に分離することができる（たとえば、葉柄から葉を分離することができ、及び/又は葉柄及び葉を茎から分離することができる）。収穫された植物又は個々の部分又は小片をさらに部分又は小片に分割することができる（たとえば、フィルター型の小片、顆粒、粒子状物質又は微粉として特徴付けることができる部分又は小片に葉を細断する、切断する、砕く、粉碎する、粉にする又は磨り潰すことができる）。植物又はその一部を外部の力又は圧力（たとえば、30
圧迫することによって又はロール処理に供することによって）に供することができる。そのような圧迫条件を実施する場合、植物又はその一部は、天然の水分含量（たとえば、収穫直後の水分含量）に近似する水分含量、植物又はその一部に水分を加えることによって達成される水分含量、又は植物又はその一部を乾燥した結果生じる水分含量を有することができる。たとえば、粉末化した、粉碎した、磨り潰した、又は粉にした植物又はその一部の小片は、約25重量パーセント未満の、多くは約20重量パーセント未満の及び頻繁には約15重量パーセント未満の水分含量を有することができる。

【0030】

Nicotiana 種の植物又はその一部を他の種類の加工条件に供することができる。たとえば、成分を互いに分離することができ、さもなければ、化学的分類又は個々の化合物の混合物に分画化することができる。典型的な分離工程には、1以上方法工程（たとえば、極性溶媒、有機溶媒又は臨界流体を用いた溶媒抽出）、クロマトグラフィ、蒸留、40
濾過、再結晶化、及び/又は溶媒/溶媒の区分化を挙げることができる。例となる抽出及び分離の溶媒又はキャリアには、水、アルコール（たとえば、メタノール又はエタノール）、炭化水素（たとえば、ヘプタン及びヘキサン）、ジエチルエーテル、塩化メチレン及び超臨界二酸化炭素が挙げられる。*Nicotiana* 種から成分を抽出するのに有用な例となる技法は、すべて参照によって本明細書に組み入れられる *Florie* への米国特許第4,144,895号; *Osborne, Jr.* への同第4,150,677号; *Reid* への同第4,267,847号; *Wildman* への同第4,289,147号; *Brummer* への同第4,351,346号; *Brummer* への同第4,35
50

9, 059号; Mullerへの同第4, 506, 682号; Keritsisへの同第4, 589, 428号; Sogaらへの同第4, 605, 016号; Poulosらへの同第4, 716, 911号; Niven, Jr.らへの同第4, 727, 889号; Bernasekらへの同第4, 887, 618号; Clappらへの同第4, 941, 484号; Faggらへの同第4, 967, 771号; Robertsらへの同第4, 986, 286号; Faggらへの同第5, 005, 593号; Grubbsらへの同第5, 018, 540号; Whiteらへの同第5, 060, 669号; Faggへの同第5, 065, 775号; Whiteらへの同第5, 074, 319号; Whiteらへの同第5, 099, 862号; Whiteらへの同第5, 121, 757号; Faggへの同第5, 131, 414号; Munozらへの同第5, 131, 415号; Faggへの同第5, 148, 819号; Kramerへの同第5, 197, 494号; Smithらへの同第5, 230, 354号; Faggへの同第5, 234, 008号; Smithへの同第5, 243, 999号; Raymondらへの同第5, 301, 694号; Gonzalez-Parraらへの同第5, 318, 050号; Teagueへの同第5, 343, 879号; Newtonへの同第5, 360, 022号; Clappらへの同第5, 435, 325号; Brinkleyらへの同第5, 445, 169号; Lauterbachへの同第6, 131, 584号; Kierulffらへの同第6, 298, 859号; Muaraへの同第6, 772, 767号; 及びThompsonへの同第7, 337, 782号にて記載されている。また、参照によって本明細書に組み入れられるBrandtら、LC-GC Europe, p. 2-5 (March, 2002)及びWellings, A Practical Handbook of Preparative HPLC (2006)にて言及された分離法の種類も参照のこと。加えて、植物又はその一部を、参照によって本明細書に組み入れられるIshikawara、Chem. Pharm. Bull., 50, 501-507 (2002); Tienpontら、Anal. Bioanal. Chem., 373, 46-55 (2002); Ochiai, Gerstel Solutions Worldwide, 6, 17-19 (2006); Coleman, IIIら、J. Sci. Food and Agric., 84, 1223-1228 (2004); Coleman, IIIら、J. Sci. Food and Agric., 85, 2645-2654 (2005); Pawlischyn編、Applications of Solid Phase Microextraction, RSC Chromatography Monographs, (Royal Society of Chemistry, UK) (1999); Sahrarouira、J. Chrom., 1210, 229-233 (2008); 及びRaymondらへの5, 301, 694にて言及された種類の処理に供することができる。

【0031】

特に、特定の実施形態では、植物物質から1以上の所望の化合物を抽出するのに十分な条件下(たとえば、好適な圧力及び温度)にて植物又はその一部を溶媒に接触させることによってNicotiana種の植物物質又はその一部から1以上の当該化合物を抽出する。一部の実施形態では、溶媒はメタノール又はヘキサンのような有機溶媒である。他の実施形態では、溶媒は乾燥蒸気である。乾燥蒸気(無水蒸気とも言う)は、最少含量の懸濁水粒子(すなわち、水分)を有する蒸気である。たとえば、乾燥蒸気は通常、約5重量%未満の水粒子又は約10重量%未満の水粒子を含む。

【0032】

抽出工程が実施される温度及び圧力は様々であることができる。しかしながら、一部の実施形態では、好適な抽出は常温及び常圧にて達成される。さらに、溶媒がタバコ材料と接触する時間の量は様々であることができる。本発明から逸脱することなくさらに長い又はさらに短い時間を使用することができるが、通常、溶媒はおよそ2時間、タバコ材料に接触したままである。

【0033】

本発明の方法に従って得られる抽出物に存在することができる例となる当該化合物には

、ソラノン、ネオフィタジエン、メガスティグマトリエノン、 α -ダマセノン、ノルソラナジオン、シス-アピエノール、 β -センプラトリエンジオール、 α -センプラトリエンジオール、スクロースエステル、及びノ又はルテインが挙げられるが、これらに限定されない。

【0034】

抽出した生成物のさらなる加工は多数の方法にて行うことができる。さらに加工する方法は、抽出物に存在する化合物及びノ又は抽出で使用された溶媒の種類に左右され得る。

【0035】

たとえば、有機溶媒（たとえば、メタノール又はヘキサン）を使用してタバコ材料から1以上の化合物を抽出する場合、タバコ材料に接触させた溶媒を単に濾過して粒子状のタバコ材料を取り除くことができ、濾液は濃縮することができる。

10

【0036】

乾燥蒸気を使用してタバコ材料から1以上の化合物を抽出する場合、乾燥蒸気は接触工程の後、通常濃縮されて蒸気蒸留物が得られる。特定の実施形態では、この蒸留方法は乾燥させたタバコ材料の様々な混合物で実施される。たとえば、一実施形態では、鉄管乾燥タバコ、パーレータバコ及びオリエンタルタバコの混合物が使用される。精油の製造に使用される方法を本明細書で用いてタバコ植物又はその一部から当該化合物を蒸留することができる。本発明に従ってタバコ植物又はその一部から当該化合物を提供するのに使用することができる又は使用するために改変することができる例となる蒸気蒸留の過程及び条件については、参照によって本明細書に組み入れられるMcKellipらへの米国特許第5,891,501号を参照のこと。このように物質を加工するのに使用される装置の種類は、たとえば、ペパーミント油の単離に従来採用されている種類であることができる。特定の実施形態では、蒸気蒸留は互いに分離することができる水濃縮物層及び油性層を含む。

20

【0037】

こうしてタバコ材料から得られる油性層は通常1以上の当該化合物（たとえば、ネオフィタジエン、ソラノン、メガスティグマトリエノン異性体、 α -ダマセノン、ノルソラナジオン）を含む。特定の実施形態では、油性層は、上述の1以上の当該化合物を含む風味化合物が有利に豊富であり、本質的にアルカロイドを含まない。たとえば、特定の実施形態では、油性層は、約15重量%未満、約10重量%未満、約5重量%未満、約2重量%未満、約1重量%未満、又は約0.5重量%未満のアルカロイドを含有する。油性層に存在する他の化合物の比率は、たとえば、本明細書で提供される方法による蒸留に供されるタバコの種類に応じて変化することができる。

30

【0038】

蒸留工程から生じる廃水は、特定の実施形態では、当該化合物（油性層に存在すると言及された当該化合物を含むが、これらに限定されない）も含む。これらの化合物は、蒸留工程が顕著に水溶性である特定の化合物を提供することができるので、油性層及び水の双方に存在すると考えられる。従って、一部の実施形態では、当該化合物は、蒸留工程によって産出される廃水から単離される。たとえば、一部の実施形態では、風味化合物及びノ又はニコチンは廃水に存在する。廃水における種々の揮発性及び半揮発性の化合物比率は時間の関数として変化することが留意される。従って、廃水の種々の分画を別々に回収して高い比率の特定の化合物を含有する溶液を提供することができる。従って、本発明は、蒸留による所望の化合物の抽出を提供し、その際、所望の化合物は蒸留物の油性層、蒸留物の水性層、及びノ又は蒸留工程の間に産出される廃水にて提供される。

40

【0039】

Nicotiana植物又はその一部に由来する種々の化合物又は化合物の混合物を本明細書で提供される方法によって単離することができる。本明細書で使用されるとき、「単離された成分」又は「植物単離物」は、Nicotiana種の植物又はその一部から分離された化合物又は化合物の複雑な混合物である。単離された成分は、単一化合物、類似の化合物の相同混合物（たとえば、風味化合物の異性体）、又は似ていない化合物（た

50

例えば、異なる種類、好ましくは望ましい感覚的特質を有する種々の化合物の複雑な混合物)の非相同混合物であることができる。本明細書に記載される抽出方法に供されているタバコ材料をさらに加工して、たとえば、それから1以上の追加の化合物を抽出し得る。たとえば、参照によって本明細書に組み入れられるHavkin-Frenkelへの米国特許出願公開番号2008/0254149を参照のこと。

【0040】

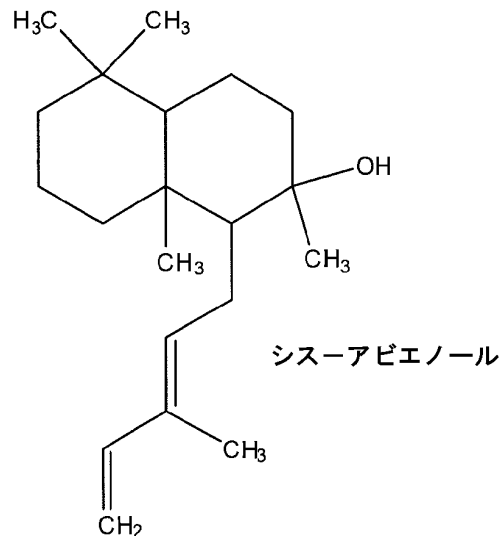
本発明によれば、異なる風味及び芳香の特徴を有する種々の化合物をNicotiana種の植物から抽出する及び/又は単離することができる。それらの化合物の特定のは、温度、湿度及び気圧の正常な周囲条件下で揮発性であるとみなすことができる。好まれる化合物は相対的に低い濃度で好意的な感覚的特質を示す。Nicotiana植物に存在し、本明細書に記載される方法によって抽出され、単離されるその種の化合物の例には、ソラノン、ネオフィタジエン、メガスティグマトリエノン、 β -ダマセノン、ノルソラナジオン、シス-アピエノール、 β -センブラトリエンジオール、 α -センブラトリエンジオール、スクロースエステル、及び/又はルテインが挙げられる。

10

【0041】

その構造が以下に示されるシス-アピエノールはタバコの緑の葉における主要なラブダノイドである。たとえば、シス-アピエノールは一般にオリエンタルタバコに見られる。

【化1】



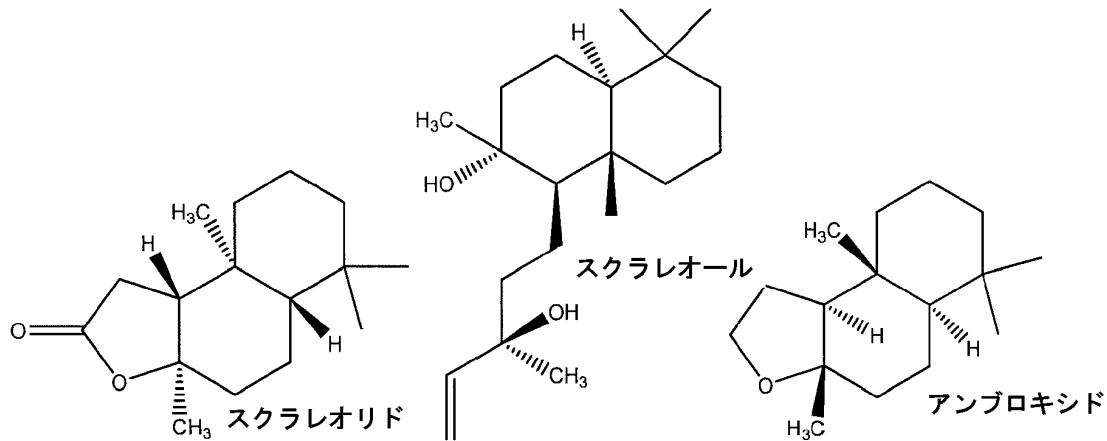
20

30

【0042】

緑色のオリエンタルタバコの空気乾燥及び日干し乾燥の間に、多数のラブダノイド分解産物が形成されるので、シス-アピエノールの濃度は通常、十分に低下する。ラブダノイド分解産物は構造的にシス-アピエノールに類似し、たとえば、その構造が以下で示されるスクラレオリド、スクラレオール及びアンプロキシドが含まれる。これらの分解産物は、オリエンタルタバコを含むタバコ製品にスギの特徴を付与することが知られている。

【化2】



10

【0043】

単離されたシス - アピエノールには、喫煙製品及びノ又は無煙タバコ製品にて多数の応用がある。一部の実施形態では、単離されたシス - アピエノールを種々の手段によって分解し、分解産物を喫煙製品及びノ又は無煙タバコ製品にて使用することができる。たとえば、特定の実施形態では、単離されたシス - アピエノール及びノ又はその分解産物は、タバコに由来する天然の風味物質（たとえば、トルコの代替風味材）又はオリエンタルタバコの代替物として使用される。一部の実施形態では、シス - アピエノール及びノ又はその分解産物は、治療応用又は栄養補助応用に使用される。たとえば、ラブダノイド化合物は抗癌活性を示している。たとえば、参照によって本明細書に組み入れられる Jungら、*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 3295 - 98 (1998)を参照のこと。一部の実施形態では、シス - アピエノールは他の化合物の調製における基質として使用される。たとえば、アテローム性硬化症のリスクを下げ得るコレステロールエステル転移タンパク質阻害剤であるウエイデンジオールの合成における基質としてそれは使用されている。たとえば、参照によって本明細書に組み入れられる Barreroら、*Tetrahedron*, 54: 5635 - 5650 (1998)を参照のこと。

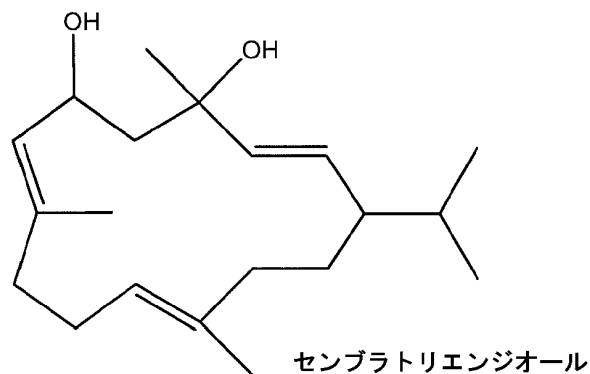
20

【0044】

その構造が以下で示されるセンブラトリエンジオール（たとえば、 α - 2,7,11 - センブラトリエン - 4,6 - ジオール及び β - 2,7,11 - センブラトリエン - 4,6 - ジオール）は、*Nicotiana tabacum*の葉及び花にて多量に見い出される。タバコの葉を乾燥させる間でのこれらの化合物の生分解はある範囲の風味化合物の形成を生じる。センブラトリエンジオールは以下で描かれる構造を有する。

30

【化3】



40

【0045】

単離されたセンブラトリエンジオールは、喫煙製品及びノ又は無煙タバコ製品にて多数の応用がある。一部の実施形態では、単離されたセンブラトリエンジオールは種々の手段

50

によって分解され、分解産物は喫煙製品及び/又は無煙タバコ製品にて使用される。たとえば、特定の実施形態では、単離されたセンブラトリエンジオール及び/又はその分解産物はタバコ由来の天然の風味物質として使用される。一部の実施形態では、センブラトリエンジオール及び/又はその分解産物は治療応用に使用される。たとえば、センブラトリエンジオールは、癌及び特定の神経変性疾患の治療における潜在的な健康利益を提供することが分っている。たとえば、参照によって本明細書に組み入れる Saito ら、*Agric. Biol. Chem.* 51(3): 941-43 (1987) 及び Mizusaki らへの米国特許第 4,701,570 号を参照のこと。センブラトリエンジオール及びその誘導体は、喫煙を阻止する及び/又はニコチン中毒を治療する薬剤としても有用であり得る。たとえば、El Sayed ら、*Expert Opin. Invest. Drugs*, 16(6): 877-87 (2007) を参照のこと。

10

【0046】

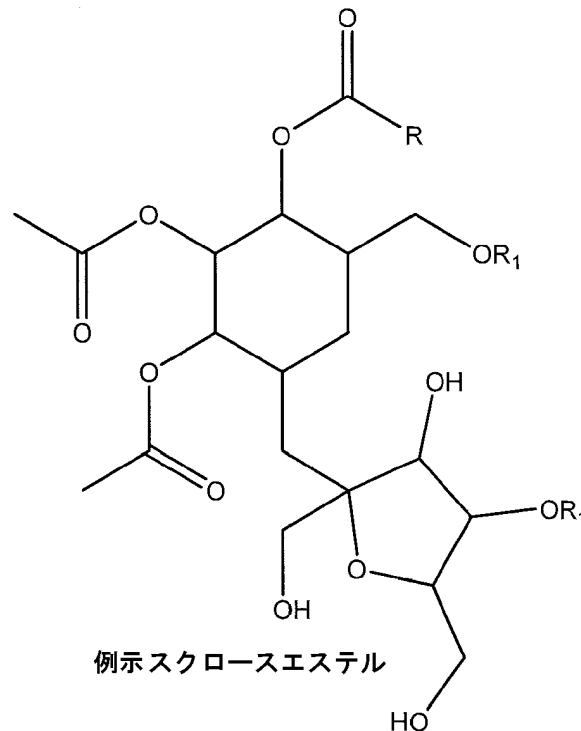
スクロースエステルは、スクロースのグルコース部分の水酸基に結合した低分子カルボン酸を特徴とする糖脂質化合物である。スクロースエステルは、オリエンタルタバコの風味に關与する最も重要な芳香及び感覚の前駆体の一部であるとみなされる。たとえば、参照によって本明細書に組み入れる Leffingwell ら、*Rec. Adv. Tob. Sci.* 14: 169-218 (1998) を参照のこと。

【0047】

スクロースエステルは通常、グルコース環上に3つのアシル基を含むスクロース分子であり、アシル基の各炭化水素は3~8の炭素原子を含み、任意で1以上の二重結合を含む。スクロースエステルは通常また、グルコース環又はフルクトース環のいずれかでアセチル基を含み、それがテトラ-アシルスクロースエステルとしてのこれらエステルへの共通する参照を生じる。本発明に従って単離したスクロースエステルの正確な構造は、置換、鎖長、及びアシル基の飽和に關して幾分変化することができ、オリエンタルタバコのほとんどのスクロースエステルは以下の構造によって包含される。

20

【化4】



30

40

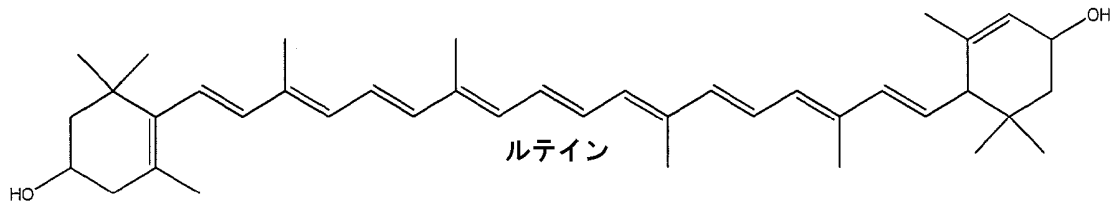
式中、RはC3~C8の炭化水素であり、それは直鎖又は分枝鎖であることができ、及び飽和又は不飽和であることができ、R₁置換基は双方ともHであり、又は一方のR₁がHであり、他方がアセチル(-C(O)CH₃)である。ほとんどの一般的なR基はブチル、ペンチル及びヘキシルを含む。

50

【0048】

その構造が以下で示されるルテインは、タバコにおける主要なカロテノイド色素である。

【化5】

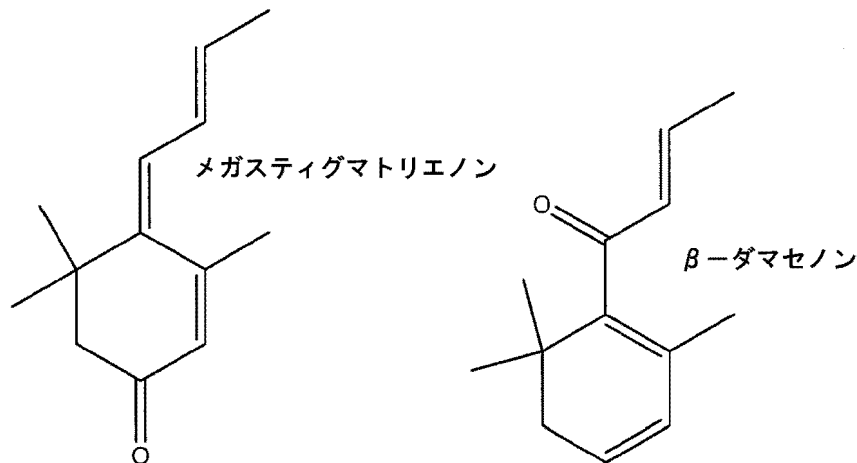


10

【0049】

ルテインは、緑葉のタバコの空気乾燥の間に分解して幾つかのイオン及びその誘導体を生成することが知られている。ルテインの2つの重要な種類の誘導体は、メガスティグマトリエノン及びβ-ダマセノンである。これらの化合物は乾燥タバコの芳香特性に影響を及ぼす。ルテインの分解産物であることに加えて、その構造が以下で示されるメガスティグマトリエノン及びβ-ダマセノンはまた、本明細書で提供される方法に従ってタバコから別々に抽出され、単離され得る。

【化6】



20

30

【0050】

単離されたルテインは喫煙製品及び/又は無煙タバコ製品にて多数の応用があり得る。一部の実施形態では、単離されたルテインを種々の手段によって分解し、それから産出される分解産物を喫煙製品及び/又は無煙タバコ製品にて使用することができる。たとえば、特定の実施形態では、単離されたルテイン及び/又はその分解産物は、タバコに由来する天然の風味物質、着色剤又は抗酸化剤として使用され得る。ルテインはまた栄養化合物及び/又は治療用化合物としても有用である。たとえば、参照によって本明細書に組み入れられるGranadoら、Br. J. Nutr. 90(3): 487-502 (2003); Siesら、Int. J. Vitam. Nutr. Res. 73(2): 95-100 (2003); 及びKrinskyら、Annu. Rev. Nutr. 23(2): 171-201 (2003)を参照のこと。

40

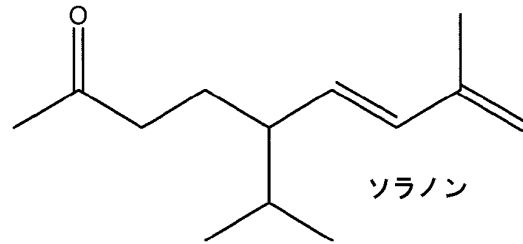
【0051】

ソラノンは、有用なタバコ風味剤及び風味増強剤である化合物である。バーレータバコの芳香に存在することが特に言及される。たとえば、参照によって本明細書に組み入れられるDomleら、Helv. Chim. Acta, 55(6): 1866-1882 (1972)を参照のこと。それは合成手段(たとえば、参照によって本明細書に組み入れられるJohnson et al., J. Org. Chem. 30(9): 2918-2921 (1965); 及びHallらへの米国特許第4,433,695号及びLightらへの同第4,547,594号を参照)によって一般的に生産されるけれども、ソラノンはタバコに存在し、本明細書で提供さ

50

れる手段に従って単離されてもよく、その構造は以下に示される。

【化7】



10

【0052】

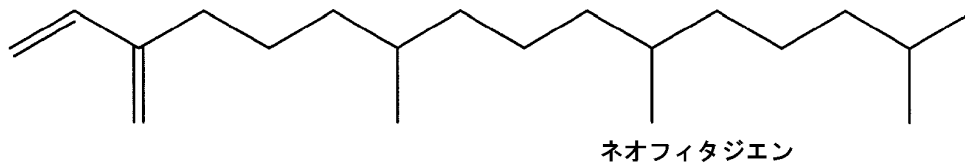
単離されたソラノンには喫煙製品及び/又は無煙タバコ製品にて多数の応用があり得る。一部の実施形態では、単離されたソラノンは種々の手段によって分解され、分解産物が喫煙製品及び/又は無煙タバコ製品にて使用され得る。たとえば、特定の実施形態では、単離されたソラノン及び/又はその分解産物はタバコに由来する天然の風味物質として使用され得る。

【0053】

その構造が以下で示されるネオフィタジエンはタバコの煙の噴霧質における揮発物を捕捉することによって風味キャリアとして作用し得るタバコの風味増強剤であることが報告されている。たとえば、J. C. Leffingwell, Leaf chemistry: basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types. Tobacco: Production, Chemistry and Technology, 265-284 (1999)を参照のこと。

20

【化8】



30

【0054】

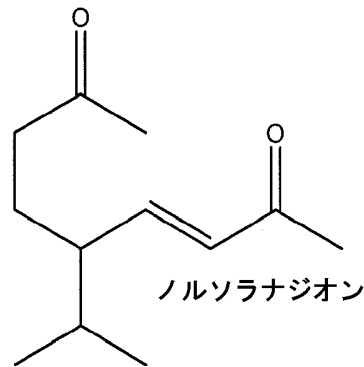
単離されたネオフィタジエンには喫煙製品及び/又は無煙タバコ製品にて多数の応用があり得る。一部の実施形態では、単離されたネオフィタジエンは種々の手段によって分解され、分解産物が喫煙製品及び/又は無煙タバコ製品にて使用され得る。たとえば、特定の実施形態では、単離されたネオフィタジエン及び/又はその分解産物はタバコに由来する天然の風味物質として使用され得る。

【0055】

その構造が以下で示されるノルソラナジオンは、タバコ風味剤として及び喫煙タバコの芳香及び味を増強する又は向上させることにおいて有用であることが知られる別の化合物である。ソラノンと同様に、この化合物は単離されるよりはむしろ一般的に合成される。たとえば、参照によって本明細書に組み入れられるLightへの米国特許第4,517,385号を参照のこと。

40

【化9】



10

【0056】

単離されたノルソラナジオンには喫煙製品及び／又は無煙タバコ製品にて多数の応用があり得る。一部の実施形態では、単離されたノルソラナジオンは種々の手段によって分解され、分解産物がタバコ製品にて使用され得る。たとえば、特定の実施形態では、単離されたノルソラナジオン及び／又はその分解産物はタバコに由来する天然の風味物質として使用され得る。

【0057】

タバコからの当該化合物の抽出に続いて、本発明に従って特定の化合物をさらに単離し、精製することが望ましい。本明細書で開示される抽出工程が通常、化合物の複雑な混合物をもたらすので、それらはさらに処理されて化合物の所望の混合物及び／又は単一の単離された化合物を提供しなければならない（たとえば、少なくとも約75重量%の化合物（単数）又は化合物（複数）が得られなければならない）。

20

【0058】

そのような混合物及び／又は単一の化合物が提供される手段は様々であることができる。追加の溶媒抽出（たとえば、極性溶媒、有機溶媒又は超臨界流体を用いた溶媒抽出）、クロマトグラフィ、蒸留、濾過、再結晶化、及び／又は溶媒／溶媒の区分化を用いて抽出物から所望の化合物を単離し得る及び／又は精製し得る。

【0059】

一部の実施形態では、複数の方法を用いて所望の化合物を単離し得る。たとえば、溶媒抽出を1以上のクロマトグラフィ法と組み合わせ得る。抽出を介して得られた試料を溶媒に溶解し、フラッシュクロマトグラフィに直接注入し得る又は注入に先立って何らかの方法で処理し得る。別の例では、一部の実施形態では、試料を先ず処理して、フラッシュクロマトグラフィによって単離される化合物と同様の条件下で溶出することが分かっている1以上の化合物を取り除く。特定の一実施形態では、タバコ材料のメタノール抽出で得られた抽出物を処理してクエルセチン-3-ルチノシド（「ルチン」）を取り除く。たとえば、水、メタノール及び塩化メチレンを加え、メタノール／水の層にルチンを抽出することによってルチンを取り除くことができる。塩化メチレン層を濃縮し、さらに処理して（たとえば、クロマトグラフィによって）その中に含有される所望の化合物を単離及び／又は精製することができる。他の実施形態では、抽出物を溶解し、クロマトグラフィ分離に直接供することができる。

30

40

【0060】

一部の実施形態では、分取用液体クロマトグラフィを用いてタバコ抽出物から特定の当該化合物を単離及び／又は精製することができる。一部の実施形態では、標準の溶出時間に基づく分取用液体クロマトグラフィを用いて当該の化合物（単数）又は化合物（複数）を単離する。Waters、Agilent Technologies及びBio-Radを含むメーカーから種々の自動化された分取用LC方式が利用可能である。使用される分取用LC方式の特定のパラメータが当業者によって変えられ、所望のレベルの分離を達成することができる。たとえば、溶媒は、当該化合物を溶解するのに十分な溶媒又は溶

50

媒の混合物であり得る。溶媒は、たとえば、水、メタノール、エタノール、酢酸エチル、ジエチルエーテル、塩化メチレン、クロロホルム、石油エーテル及び/又はヘキサンであり得る。均一濃度の又は勾配のある溶媒系（すなわち、2以上の溶媒の比を時間の関数として変化させること）によって方式が操作され得る。一部の実施形態では、当該化合物と混合物に存在する化合物の間で最良の分離を提供するように溶媒系を選択することができる。系の流速は、たとえば、約10ml/分~約100ml/分（たとえば、約36ml/分）で変えられ得る。

【0061】

一部の実施形態では、フラッシュクロマトグラフィを用いてタバコ抽出物から当該化合物を単離し及び/又は抽出する。フラッシュクロマトグラフィ方式は当該技術で既知であり、例となる方式は、たとえば、参照によって本明細書に組み入れられる

Stillら、J. Org. Chem. 42: 2923 - 2925 (1978) 及び Andrewsへの米国特許第4,591,442号にて議論されている。Biotope、Teledyne Isco、Grace Davison Discovery Sciences及びBuchiを含むメーカーから種々の自動化されたフラッシュクロマトグラフィ方式が利用可能である。フラッシュクロマトグラフィは、カラムが通常相対的に大きな粒子サイズを有し（たとえば、大まかに30~40µm）、大量の試料を収容することができ、注入当たり単離されるさらに多くの当該化合物を可能にするので、合理的に大量の化合物を提供するのに望ましくてもよい。

【0062】

使用されるフラッシュクロマトグラフィ方式の特定のパラメータが当業者によって変えられ、所望のレベルの分離を達成することができる。たとえば、溶媒は、当該化合物を溶解するのに十分な溶媒又は溶媒の混合物であり得る。溶媒は、たとえば、水、メタノール、エタノール、酢酸エチル、ジエチルエーテル、塩化メチレン、クロロホルム、石油エーテル及び/又はヘキサンであり得る。均一濃度の又は勾配のある溶媒系（すなわち、2以上の溶媒の比を時間の関数として変化させること）によって方式が操作され得る。一部の実施形態では、当該化合物と混合物に存在する化合物の間で最良の分離を提供するように溶媒系を選択することができる。系の流速は、たとえば、約20~約200ml/分（たとえば、約150ml/分）で変えられ得る。

【0063】

フラッシュクロマトグラフィは十分な精製レベルで当該化合物を提供してもよいし、しなくてもよい。特定の実施形態では、当該化合物に相当する分画を回収し、合わせ、濃縮して十分な精製レベルで当該化合物を含む単離物を得てもよい（すなわち、当該化合物は単離物の十分な重量比率で存在する）。たとえば、本発明の単離物は、約75重量%を超える、約80重量%を超える、約85重量%を超える、約90重量%を超える、約95重量%を超える、約98重量%を超える、又は約99重量%を超える量で当該化合物を含む。一部の実施形態では、フラッシュクロマトグラフィから得られた分画を、分取用液体クロマトグラフィを用いてさらに分離することができる。

【0064】

一部の実施形態では、単離された化合物又はその混合物をこれらの化合物が化学変換を受けるように条件に供することができる。たとえば、Nicotiana種の植物又はその一部から得られたタバコ材料を、化学変換を起こすように又は他の成分と混合されるように処理することができる。一部の実施形態では、それらから得た抽出物又は単離された化合物（単離物）を、化学変換を起こすように又は他の成分と混合されるように処理することができる。タバコ材料、抽出物又は単離された化合物の化学変換又は修飾は、タバコ材料、抽出物又は単離された化合物の特定の化学的特性及び物理的特性（たとえば、その感覚的特質）の変化を生じる。例となる化学修飾工程は、酸/塩基反応、加水分解、酸化、熱及び/又は酵素処理によって実施することができ、そのようなものとして化合物は種々の分解反応を受けることができる。

【0065】

特定の実施形態では、タバコ材料、抽出物又は単離物を処理して分解産物を提供する（たとえば、ルテインは処理されて、メガスティグマトリエノン及びノ又は - ダマセノンを含む種々の風味化合物を提供し得る；シス - アピエノールは処理されてスクラレオリド、スクラレオール及びノ又はアンプロキシドを提供し得る）。分解産物は、本発明に従って抽出される及びノ又は単離される化合物から生産される化合物である。分解産物は、そのような化合物から天然に形成することができ、又は加速された分解工程によって生産され得る（たとえば、熱及びノ又は化学物質の添加によって化合物の分解を加速する）。これらの化合物は、たとえば、（たとえば、 H_2O_2 又は他の酸化剤を介した）酸化及びノ又は加水分解反応によって分解することができる。

【0066】

本発明に係るタバコ材料、抽出物又は単離物と混合することができるさらなる成分の例となる種類には、1以上の風味剤、充填剤、結合剤、pH調整剤、緩衝化剤、着色剤、崩壊助剤、抗酸化剤、保湿剤及び保存剤が挙げられる。

【0067】

本発明の抽出物及び単離物は、タバコ組成物、特に喫煙物品又は無煙タバコ製品に組み込まれるタバコ組成物に添加される成分として有用である。タバコ組成物への抽出物又は単離物の添加は、抽出物又は単離物の性質及びタバコ組成物の種類に応じて様々な方法でタバコ組成物を向上させることができる。例となる抽出物及び単離物は、タバコ製品に風味及びノ又は芳香を提供するように役立つことができる（たとえば、タバコ組成物又はそれに由来する煙の感覚特性を変える組成物）。本発明の抽出物及び単離物はまた、その中
20
に他のタバコ材料を含有しないタバコ製品の成分として使用することができる。言い換えれば、本発明の抽出物又は単離物は、たとえば、口腔で溶解する又は溶融するように適合させた製品のような経口無煙タバコ組成物に抽出物又は単離物を組み入れることによって、本発明のタバコ製品にてタバコの唯一の供給源として使用されてもよい。

【0068】

本発明に従って得られる抽出物又は単離物の形態は様々であることができる。通常、単離物は固体、液体又は半固体又はゲルの形態である。単離物は、凝固した形態、純粋な形態又は原液の形態で使用することができる。単離物の固体形態には、スプレー乾燥した形態及び凍結乾燥した形態が含まれる。単離物の液体形態には、水性又は有機溶媒のキャリア中に含有される単離物が含まれる。
30

【0069】

抽出物又は単離物は、様々な方法でタバコ組成物の成分として使用することができる。抽出物又は単離物は加工されたタバコの成分として使用することができる。1つの点においては、抽出物又は単離物は、タバコ細長片への適用のための外包配合組成の中で（たとえば、参照によって本明細書に組み入れられる *Shelar* への米国特許第 4, 819, 668 号にて言及された方式及び方法の種類を用いて）、又は先端装飾配合組成の中で使用することができる。或いは、抽出物又は単離物は、再構成されたタバコ材料の成分として使用することができる（たとえば、参照によって本明細書に組み入れられる *Sohn* への米国特許第 5, 143, 097 号；*Brinkley* への同第 5, 159, 942 号；*Jacob* への同第 5, 598, 868 号；*Young* への同第 5, 715, 844 号
40
；*Gellatly* への同第 5, 724, 998 号；及び *Kumar* への同第 6, 216, 706 号にて一般に言及された種類のタバコの再構成方法を用いて）。抽出物又は単離物は、紙巻タバコフィルターに組み込むことができ（たとえば、フィルタープラグ、プラグラップ又はチップペーパーにて）、又は紙巻タバコの製造工程の間で、紙巻タバコの巻き紙に、好ましくは内面にて組み入れることができる。

【0070】

Nicotiana 由来の抽出物又は単離物は、喫煙物品に組み入れることができる。代表的なタバコのブレンド、非たばこ成分及びそれらから製造される代表的な紙巻タバコは、*Lawson* への米国特許第 4, 836, 224 号；*Perfetti* への同第 4, 924, 888 号；*Brown* への同第 5, 056, 537 号；*Gentry* への
50

同第5, 220, 930号;及びBlakleyらへの同第5, 360, 023号;Shafferらへの米国特出願2002/0000235;及びPCT WO02/37990にて言及されている。これらのタバコ材料はまた、Sensabaughへの米国特許出願第4, 793, 365号;Clearmanらへの同第4, 917, 128号;Brooksらへの同第4, 947, 974号;Korteへの同第4, 961, 438号;Lawrenceらへの同第4, 920, 990号;Clearmanらへの同第5, 033, 483号;Gentryらへの同第5, 074, 321号;Drewettらへの同第5, 105, 835号;Riggsらへの同第5, 178, 167号;Clearmanらへの同第5, 183, 062号;Shannonらへの同第5, 211, 684号;Deeviらへの同第5, 247, 949号;Riggsらへの同第5, 551, 451号;Banerjeeらへの同第5, 285, 798号;Farrierらへの同第5, 593, 792号;Bensalemらへの同第5, 595, 577号;Countsらへの同第5, 816, 263号;Barnesらへの同第5, 819, 751号;Beverらへの同第6, 095, 153号;Nicholsらへの同第6, 311, 694号;及びNicholsらへの同第6, 367, 481号;Robinsonらへの米国特許出願公開番号2008/0092912及びPCT WO97/48294及びPCT WO98/16125にて記載されている種類の紙巻タバコの製造に使用することができる。Chemical and Biological Studies on New Cigarette Prototypes that Heat Instead of Burn Tobacco, R. J. Reynolds Tobacco Company Monograph (1988)及びInhalation Toxicology, 12:5, p. 1-58 (2000)も参照のこと。

【0071】

本明細書に記載される抽出物又は単離物は、たとえば、ゆるく水分を含んだ嗅ぎ葉、ゆるく乾燥した嗅ぎ葉、噛みタバコ、粉碎したタバコ片(たとえば、丸葉、錠剤、球形、コイン、ビーズ、横長形又は豆の形状を有する)、押し出した又は形成されたタバコ細長片、小片、ロッド、円筒又は棒、微細に分割し、磨り潰した粉、紛体化した小片及び成分の微細に分割した又は粉にした塊、薄片様の小片、成形し、加工したタバコ片、タバコを含有するガムの小片、テープ様の膜の巻物、水に溶けやすい又は水分散性の膜若しくは細片(Chanへの米国特許出願公開番号2006/0198873)、又は外殻を加工しているカプセル様の物質(たとえば、天然では透明、無色、半透明である又は高度に着色している、曲げやすい又は硬質の外殻)及び内部領域を加工しているタバコ又はタバコ風味(たとえば、一部の形態のタバコを組み入れるNewtoniam液又はチキソトロピー液)のような無煙タバコ製品に組み入れることができる。種々の種類の無煙タバコ製品は、それぞれ参照によって本明細書に組み入れられるSchwartzへの米国特許第1, 376, 586号;Leviへの同第3, 696, 917号;Pittmanらへの同第4, 513, 756号;Sensabaugh, Jr.らへの同第4, 528, 993号;Storyらへの同第4, 624, 269号;Townsendへの同第4, 987, 907号;Sprinkle, IIIらへの同第5, 092, 352号;及びWhiteらへの同第5, 387, 416号;Stricklandらへの米国特許出願公開番号2005/0244521及びEngstromらへの同2008/0196730;ArnarpらへのPCT WO04/095959;AtchleyらへのPCT WO05/063060;BjorkholmへのPCT WO05/016036及びQuinterらへのPCT WO05/041699にて言及されている。それぞれ参照によって本明細書に組み入れられるAtchleyらへの米国特許第6, 953, 040号及びAtchleyらへの同第7, 032, 601号;Williamshwへの同米国特許出願公開番号2002/0162562;Williamsへの同2002/0162563;Atchleyらへの同2003/0070687;Williamsへの同2004/0020503;Breslinらへの同2005/0178398;Stricklandらへの同2006/0191548;Holton, Jr.らへの同2

10

20

30

40

50

007/0062549; Holton, Jr. への同2007/0186941; Strickland への同2007/0186942; Dube への同2008/0029110; Robinson への同2008/0029116; Mua への2008/0029117; Robinson への同2008/0173317 及び Neilsen への2008/0209586 にて言及された種類の無煙タバコの配合組成、成分及び加工方法も参照のこと。

【0072】

タバコ組成物に加えらるる又はタバコ組成物若しくはタバコ製品の中に組み入れられる抽出物又は単離物の量は、その抽出物又は単離物の所望の機能、その抽出物又は単離物の化学構成、及び抽出物又は単離物に加えらるるタバコ組成物の種類に左右され得る。タバコ組成物に加えらるる量は様々であることができるが、通常、抽出物又は単離物に加えらるるタバコ組成物の総乾燥重量に基づいて約5 ppm ~ 約5重量パーセントに及び得る。加えらるる量は、たとえば、そのような化合物又は化合物混合物の添加によって達成される目標（たとえば、風味の向上）及び加えらるる化合物又は化合物混合物の特定の特徴に応じて変化してもよい。

【0073】

実験

本発明の特定の態様を説明するために言及され、その限定として解釈されるべきではない以下の実施例によって本発明の態様をさらに完全に説明する。

【実施例】

【0074】

実施例1

スクロースエステル、ルテイン、センブラトリエンジオール及びシス - アピエノールの抽出及び単離

抽出

【0075】

Nicotiana tabacum ギャルパオタバコを収穫し、小片に刻み、メタノールで抽出する。葉を取り除き、メタノール抽出物をおよそ77重量%の固体に濃縮する。濃縮したメタノール抽出物は、上のタール様の層（メタノールに可溶性である）及び下の水性層（水に可溶性である）を含む2層に分離する。上のタール様の層が分離され、たとえば、スクロースエステル、センブラトリエンジオール及びシス - アピエノールのような葉表面の当該検体を含有することが見つかる。液体クロマトグラフィ及び/又はフラッシュクロマトグラフィによって当該検体を分離し、回収することができる。

【0076】

単離方法

分取用規模の液体クロマトグラフィを一般に用いて複雑な混合物における当該化合物を分離し、回収する（たとえば、Waters 2707 自動試料採取器、Waters DAD 検出器、Waters 2545 四次勾配モジュール、及び Waters フラクションコレクター III を含み、Waters µBondapak C18 19 x 300 mm のカラムとフラクションコレクターを備えた Waters の分取用 LC 方式を用いて）。

【0077】

分離方法は通常分析規模の液体クロマトグラフィ（Waters µBondapak C18、3.9 x 300 mm、10 µm 粒子のカラムを備えた Waters の 2695 LC 方式を用いて）で開発し、分取用規模の液体クロマトグラフィに規模を上げる。フラッシュクロマトグラフィ（たとえば、275 g の C18 金カラムを伴った Teledyne Isco Combiflash 自動化フラッシュ精製方式）用いて当該化合物を単離し得る。この技法を単独で又は分取用クロマトグラフィと直列で用いて種々の化合物を単離し、回収することができる。

【0078】

スクロースエステルの単離

分取用規模の液体クロマトグラフィによってタール様の層からスクロースエステルを単離する。タール様の混合物をメタノールに溶解し（大まかに20 mg/ml）、36 ml/分の流速、75:25のメタノール:水の均一濃度分析、及び214 nmでのWatersのDAD検出器によって操作する上述のWatersの分取用LC方式に注入する（1 ml）。スクロースエステル標準の既知の保持時間に相当する分画（約1.0と約5.6分の間に回収される）を回収し、合わせる。およそ1.6分でスクロースエステルと一緒に溶出する別の主要ピークに注目する。これら分画のHR-LC-MS解析は、このピークがクエルセチン-3-ルチノシド又はルチンに相当することを示す。HR-LC-MS解析によって決定されるタール様混合物におけるルチンの濃度はおよそ800 µg/gである。

10

【0079】

ルチノシドを含まない抽出物を生成するには、分取用LCに先立って、タール様の層にて液体/液体抽出を行う。タール様の層（約2 g）をメタノール（30 ml）に溶解する。この混合物を蒸留脱イオン水（80 ml）及び塩化メチレン（40 ml）と共に分液漏斗に加える。混合物を振盪し、水性層（ルチン含有することが示された）を捨て、塩化メチレン層を取り出し、濃縮する。得られた物質（メタノールにて再構成された）をHR-LC-MSによって解析し、それは、スクロースエステルの存在を示したが、ルチノシドの存在は示さなかった。次いでルチノシドを含まない物質を分取用LC方式に注入し、スクロースエステルを単離する。

【0080】

20

スクロースエステル標準の既知の保持時間に相当する分画を回収し、合わせる。合わせた分画を濃縮してメタノールを除き、残った水性層に塩化メチレンを1:1の比で加える。試験管を振盪し、遠心し、水性層を捨てる。塩化メチレン層を濃縮し、HR-LC-MS解析のためにイソプロピルアルコールに溶解する。タバコのメタノール抽出物のタール様の層は、およそ1,000 µg/g範囲のスクロースエステルを含有することが確定する。この抽出物は、他のオリエンタル乾燥タバコ種にて存在するものと類似のスクロースエステルの定性的分布を示す。

【0081】

ルテインの単離

上述のように先ずルチノシドを取り除くように処理するタール様の層から分取用LC方式によってルテインを単離する。常温にて対称分取用C18、19×300 mm、7 µm粒子のカラムを含み、26 ml/分の流速、当初比75:25、10分で75:25、15分で100:0及び25分で75:25のメタノールと水の溶媒系:水、及び443 nmでのWatersのDAD検出器で操作する分取用LC方式（10 ml、注入体積）にルチノシドを含まない混合物を注入する。合計分析時間30分で試行全体を通して40秒分画を回収するようにフラクションコレクターを設定する。これらの条件下（分取用LC方式に以前注入したルテイン標準と相関して）にてルテインはおよそ18.7分で溶出する。

30

【0082】

ルテインはフラッシュクロマトグラフィによってもタール様の層から単離される。上述のように先ずルチノシドを取り除くように処理したタール様の層の試料をフラッシュクロマトグラフィ方式に注入する（15 ml、注入体積）。流速150 ml/分、当初比75:25、5分で75:25、7分で100:0及び15分で75:25の溶媒（メタノールと水）勾配にて、443 nmでの検出器によってフラッシュクロマトグラフィ方式を操作する。シス-アピエノールの溶出後、443 nmにてシグナルを生じる分画をフラッシュクロマトグラフィ方式にて回収し、合わせ、濃縮する（たとえば、50 に設定したBuchii Rotavaporユニット及び337ミリバールの真空を用いて）。合わせて濃縮した分画を溶解し、常温にて対称分取用C18、19×300 mm、7 µm粒子のカラムを含み、26 ml/分の流速、当初比75:25、3分で75:25、5分で100:0及び12分で75:25のメタノールと水の溶媒系:水、及び443 nmでのWa

40

50

t e r sのD A D検出器で操作する分取用L C方式に注入する(10ml、注入体積)。合計分析時間15分で試行全体を通して20秒分画を回収するようにフラクションコレクターを設定する。ルテインは9分で溶出する。

【0083】

分取用L C及び/又はフラッシュクロマトグラフィによって単離したルテインを含有する分画を合わせ、濃縮してメタノールを取り除いた(たとえば、50に設定したB u c h i R o t a v a p o rユニット及び337ミリパールの真空を用いて)。得られた分画はルテインの半固形形態である。

【0084】

センブラトリエンジオールの単離

分取用規模の液体クロマトグラフィによってタール様の層からセンブラトリエンジオールを単離する。上述のようなタール様の層の試料をフラッシュクロマトグラフィ方式に注入する(1ml、注入体積)。36ml/分の流速、均一濃度の溶媒系(75:25のメタノール:水)及び214nmで設定した検出器によってフラッシュクロマトグラフィ方式で操作する。214nmでシグナルを生じる分画をフラッシュクロマトグラフィ方式にて回収した。合計分析時間10分で試行全体を通して20秒分画を回収するようにフラクションコレクターを設定する。 - センブラトリエンジオール及び - センブラトリエンジオールの標準の保持時間を用いて、これらの化合物のそれぞれに相当する分画を回収し、別々に合せた。この方式では、 - センブラトリエンジオールは9.0分で溶出し、 - センブラトリエンジオールは6.9分で溶出する。

【0085】

単離した分画を別々に濃縮し、分画からメタノールを取り除き、水溶液を残す。各単離された分画に塩化メチレンを加え、分画を振盪し、塩化メチレン層にて所望の化合物を単離し、分画を遠心する。水性層を捨て、残りの塩化メチレン層をG C / M S(たとえば、A g i l e n tからのA g i l e n t 6 8 9 0 / 5 9 7 3方式を用いて)によって解析する。単離された分画を含有するバイアルに内部標準(400ppmのt e r t - ブチルヒドロキノン)を伴ったD M F及び1% T M C Sを伴ったB S T F Aを加えることによってG C / M Sを実施する。バイアルを76で30分間保持し、30分間室温に冷却する。得られた溶液をG C / M Sによって解析し、シリル化センブラトリエンジオールのスペクトルを既知標準のスペクトルと比較することによってピークの特定制を行う。

【0086】

質量スペクトルは、合わせた分画が - 及び - センブラトリエンジオールであることを確認し、データは全面積計数に基づいてセンブラトリエンジオール双方の分画がおおよそ99%純粋であることを示す。 - センブラトリエンジオール分画は少量の糖のような化合物及びヘキサデカン酸を含有し、 - センブラトリエンジオール分画は少量の糖のような化合物及びフィトール様化合物を含有する。タバコのメタノール抽出物のタール様の層はおおよそ80mg/gの - センブラトリエンジオール及びおおよそ30mg/gの - センブラトリエンジオールを含有すると判定される。

【0087】

シス - アピエノールの単離

分取用規模の液体クロマトグラフィによってタール様の層からシス - アピエノールを単離する。タール様の層の試料を上述のように先ず、ルチノシドを取り除くように処理する。常温にて対称分取用C 1 8、19×300mm、10µm粒子のカラムを含み、36ml/分の流速、75:25の比のメタノールと水の一定濃度の溶媒系、及び214nmでのW a t e r sのD A D検出器で操作する分取用L C方式(10ml、注入体積)にルチノシドを含まない混合物を注入する。合計分析時間20分で試行(各12mlの)全体を通して20秒分画を回収するようにフラクションコレクターを設定する。これらの条件下にてシス - アピエノールはおおよそ17.0分で溶出する。

【0088】

当初、214nmにて十分な吸収ピークを持つ単離された分画は不明である。従って、

10

20

30

40

50

合わせた分画をGC/MSによって解析するが、それでは結論は出ない。試料のイオン化のための常圧化学イオン化プローブを用いたThermo TSQ Quantum UltraMS/MSに単離した分画を注入する。この技法は単離された分画における化合物の分子量が29 amuであることを示す。単離された分画をさらにUV/Vis分光法（たとえば、Hewlett Packard 8453 UV/Vis分光光度計を用いて）によって解析し、それは、最大吸収が238 nmであることを示す。この単離された分画の正体のさらなる確認は、参照によって本明細書に組み入れられるDingら、Chromatographia、66:529-532(2007)による論文におけるシス-アピエノールに関する報告されたHPLC-ESI-MSの分子量、NMR及びUV/Visのデータに基づく。

10

【0089】

シス-アピエノールは代わりにフラッシュクロマトグラフィによってもタール様の層から単離される。上述のように先ず、ルチノシドを取り除くように処理されるタール様の層の試料を、フラッシュクロマトグラフィ方式に注入する(15 ml、注人体積)。流速150 ml、当初比75:25、5分で75:25、7分で100:0及び15分で75:25の溶媒(メタノールと水)勾配にて、214 nmでの検出器でフラッシュクロマトグラフィ方式を操作する。214 nmでシグナルを生じる分画をフラッシュクロマトグラフィ方式にて回収し、合わせ、濃縮する(たとえば、50 に設定したBuchi Rotavaporユニット及び337ミリバールの真空を用いて)。合わせ、濃縮した分画を溶解し、常温にて対称分取用C18、19×300 mm、7 µm粒子のカラムを含み、流速26 ml、当初比75:25、10分で75:25、15分で100:0及び20分で75:25のメタノールと水の溶媒系、及び214 nmでのWatersのDAD検出器で操作する分取用LC方式(10 ml、注人体積)に注入する。合計分析時間30分で試行(各12 ml体積の)全体を通して20秒分画を回収するようにフラクションコレクターを設定する。シス-アピエノールはおよそ17.8分で溶出する。

20

【0090】

分取用LC法及び/又はフラッシュクロマトグラフィ法から回収したシス-アピエノール分画を濃縮して半固形形態のシス-アピエノールを提供する。シス-アピエノールの高体積の単離及び回収は通常、さらに濃縮した試料を注入することができるので、さらに大きな有効性を可能にするフラッシュクロマトグラフィ方式で実施される。場合によっては、フラッシュクロマトグラフィからの分画を、分取用HPLCを用いてさらに分離しなければならないが、フラッシュクロマトグラフィは通常、分画の分取用HPLCを必要とすることなく、シス-アピエノールの十分な分離を提供する。

30

【0091】

実施例2

スクロースエステル、ルテイン、センブラトリエンジオール及びシス-アピエノールの抽出及び単離

【0092】

鉄管乾燥タバコ、パーレータバコ及びオリエンタルタバコの混合物を乾燥蒸気蒸留に供する。具体的には、蒸気蒸留能を備えた640 ft³の台車に鉄管乾燥タバコ、パーレータバコ及びオリエンタルタバコの細長片ブレンドを置く。無水蒸気を台車に通し、分当たり約4ガロンの蒸気蒸留物を生産する。従来ペパーミント油の単離に採用された装置を用いて蒸留物を処理する。蒸気蒸留工程を開始して数分後、回収された蒸留物の表面に油の光沢が現れ始める。時間が進むにつれて、光沢は水濃縮物の上に静止する明確な油層になる。この赤みを帯びた褐色の精油を水から穏やかに取り除く。

40

【0093】

精油を塩化メチレンに溶解し、ガスクロマトグラフィ/質量分光法(GC/MS、たとえば、Agilent 5973 MSDを備えたAgilent 6890 GC)によって解析する。データは、精油が主要な揮発性及び半揮発性化合物として、ソラノン、ネオフィタジエン、パルミチン酸及びオレイン酸を含むことを示す。精油の他の成分はメガスティ

50

グマトリエノン異性体、イオノール誘導体、 α -ダマセノン及びノルソラナジオンである。

【0094】

さらに、先ず、精油単離装置を通過し、その後、下水に排出される（すなわち、「廃棄」蒸気）蒸留物水を捕捉する。時間の関数として蒸留の間に回収される「廃棄」蒸気の試料を塩化メチレンに溶解し、GC/MSによって解析する。得られたクロマト図は、「廃棄」蒸気が、精油で見い出される化合物の一部（たとえば、ネオフィタジエン、ニコチン、フルフリルアルコール及びピピリジン）を含む相当な数の揮発性及び半揮発性の化合物を含有することを示す。

【0095】

「廃棄」蒸気を水性成分及び有機成分に分離し、精油のあまり複雑ではない混合物又は個々の成分への下流の処理/分離を円滑にする。具体的には、蒸気蒸留工程からの「廃棄」蒸気をフリットガラス円筒内のシリカに加える。水吸引機を用いてシリカから水を穏やかに取り除く。カラムにヘキサンを通し、その後M T B E、さらにメタノールを通す。回転蒸発によって有機溶媒を取り除き、得られた物質を塩化メチレンにて再構成する。塩化メチレン試料をGC/MSによって解析する。ヘキサン抽出物の主要な成分はネオフィタジエンである。

【0096】

実施例3

スクロースエステル及びセンブラトリエンジオールの抽出及び単離

【0097】

室温にて約30秒間、塩化メチレンにタバコの葉を浸漬する。得られた塩化メチレン溶液を濃縮し、参照によってその全体が本明細書に組み入れられるAshraf-Khorassaniら、Beitrag Tabkforsch. Int. 23: 32-45 (2008)にて記載された方法を用いて抽出物を浄化する。

【0098】

シアノ結合のシリカカラム(25cm x 10mm、dp = 5 μ m)及び15:85:0.1の比でのエタノール/イソ-オクタン/水の移動相を用い、214nmでのUV検出器を持つ順相HPLCによって、浄化した抽出物を精製する。スクロースエステル、 α -セムプレンジオール及び β -セムプレンジオールについてピークを特定し、各ピークに相当する分画を個々に回収する。当初のオープン温度80 (2分間保持)、10 /分で140 に上げ、5 /分で300 まで上げ、300 で10分間保持するGC-FID(MS)、DB5、15m x 0.25mm(TMS誘導体)によって、各ピークに相当する分画の正体を確認する。

【0099】

本発明が関係する、前述記載で提示された教示の利益を有する当業者には多数の改変及び本発明の他の実施形態が思い浮かぶであろう。従って、本発明は開示された特定の実施形態に限定されるべきではなく、改変や他の実施形態は添付の特許請求の範囲内に含まれるように意図されることが理解されるべきである。本明細書では特定の用語が採用されるが、それらは、一般的で且つ説明する意味でのみ使用され、限定の目的では使用されない。

10

20

30

40

フロントページの続き

- (72)発明者 ジェラルディ, アンソニー・リチャード
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27104、ウインストン・セイレム、マウンテン・ビ
ユ・ロード・5208
- (72)発明者 デュベ, マイケル・フランシス
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27104、ウインストン・セイレム、ノースポンド・レ
イン・130

合議体

審判長 田村 嘉章
審判官 井上 哲男
審判官 槇原 進

- (56)参考文献 特開平4 - 126023 (JP, A)
特開昭57 - 26637 (JP, A)
特開昭61 - 109713 (JP, A)
カナダ国特許出願公開第2765872 (CA, A1)
特開平5 - 236926 (JP, A)
Robert R. Johnson et al., The Structure, Chemi
stry, and Synthesis of Solanone. A New Anoma
lous Terpenoid Ketone from Tobacco, J. Org. Ch
em, 1965年9月, Vol. 30 (9), p. 2918 - 2921,
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A24B1/00-15/42