

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014 年 5 月 1 日(01.05.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/064808 A1

- (51) 国際特許分類:  
A24B 3/16 (2006.01) G01N 31/22 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/077636
- (22) 国際出願日: 2012 年 10 月 25 日(25.10.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒1058422 東京都港区虎ノ門二丁目 2 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 吉田 洋之 (YOSHIDA, Hiroyuki); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目 1 7 番 7 号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所 (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

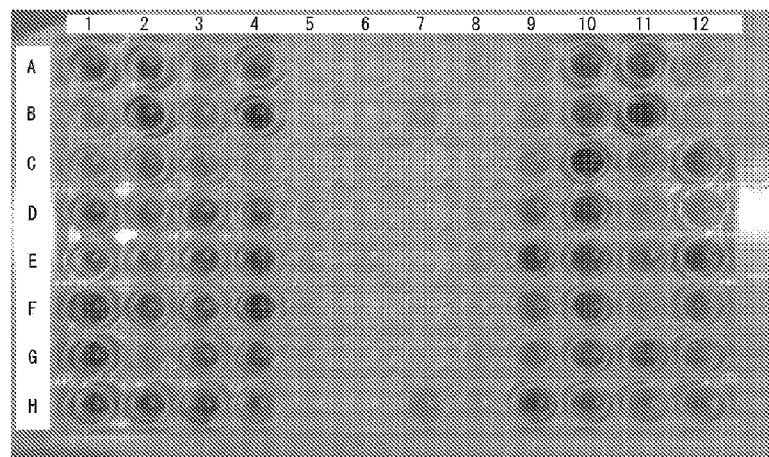
添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING KIND OF LEAF TOBACCO

(54) 発明の名称: 葉たばこの種類の判別方法

[図1]



(57) Abstract: A method for determining whether a leaf tobacco belongs to Burley cultivars or not, said method comprising: an extraction step for soaking the leaf tobacco in methanol, ethanol, water or a liquid mixture thereof to give a leaf tobacco extract; a color-development step for mixing the extract with Folin-Ciocalteu reagent and a base to develop a color; and a determination step for determining whether the leaf tobacco belongs to Burley cultivars or not on the basis of the color development of the liquid reaction mixture that is obtained in the color-development step.

(57) 要約: 葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する判別方法であって、葉たばこを、メタノール、エタノールもしくは水またはこれらの混合液に浸漬して、葉たばこの抽出液を得る抽出工程と、抽出液とフォーリン・チオカルト試薬と塩基とを混合して発色させる発色工程と、発色工程で得られた反応液における発色に基づき、葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する判別工程とを含む。



WO 2014/064808 A1

## 明 細 書

発明の名称：葉たばこの種類の判別方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、葉たばこの種類を判別する方法に関するものである。特に、葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する方法に関するものである。

### 背景技術

[0002] たばこ製品の多くは、複数の種類の葉たばこがブレンドされて製造されている。たばこ製品およびその原料について、品質保持および品質管理等を目的として、葉たばこの種類ごとの配合割合（葉組組成）を確認する場合がある。

[0003] 葉たばこの種類を特定する方法として、例えば、経験に基づいてたばこ刻の外観から判別する方法が挙げられる。また、非特許文献1および非特許文献2には、DNAマーカーを用いて葉たばこの品種を判別する方法が記載されている。

[0004] ところで、非特許文献3には、フォーリン・チオカルト法と逆相系高速液体クロマトグラフィーとを組み合わせるフェノール物質を定量する方法が記載されている。なお、フォーリン・チオカルト法以外の分析方法として、総フェノールを定量するSlinkardとSingletonの方法が知られている。また、フラボノイドおよび非フラボノイド型フェノールを定量するKramlingとSingletonの方法が知られている。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0005] 非特許文献1：“Microsatellite Markers For Tobacco Genetic Fingerprinting And Variety Identification”, Plant & Animal Genomes XIII Conference, January 15-19, 2005, Town & Country Convention Center, San Diego, CAP136 : SSR, Gregor Bindler, Florian Martin, Louis Renaud, Etienne

Kaelin, Paolo Donini, Ferruccio Gadani, Luca Rossi.

非特許文献2: “Determination of Local Tobacco Cultivars Using ISSR Molecular Markers”, Jessada Denduangboripant et al., Chang Mai J. Sci. 2010;37(2):293-303.

非特許文献3: 「フォーリン・チオカルト法を用いた逆相系高速液体クロマトグラフィーによるフェノール化合物の分析ーフェノールとフォーリン・チオカルト試薬との反応条件の至適化」, J.ASEV Jpn Vol.12 No.1 pp.21-28 (2001) .

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] しかし、上述の経験に基づいて外観から判別する方法は、主観的であり、判断者によって異なる判断をする可能性が高い。また、経験として習得した判断技術を他者に引き継ぐことは困難である。

[0007] また、非特許文献1および非特許文献2に記載されたDNAを用いる方法では、i) 判別までに相当な時間（例えば、数日）がかかる、ii) 操作方法などの特別な知識を必要とする、iii) マーカーの作成などにコストがかかる、iv) 抽出したDNAの質または量によっては解析できない、および、v) サンプルを破壊する必要がある同一サンプルを他の解析に再利用することができない、などの問題点がある。

[0008] 非特許文献3に記載の方法は、逆相系高速液体クロマトグラフィーが高価であり、かつ手間がかかる。なお、非特許文献3には、たばこを分析することは一切記載されていない。

[0009] 本発明は、上記問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、1つの葉たばこについて、その種類がバーレー種であるか否かを簡便かつ迅速に判別する方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0010] 上記課題を解決するために、本発明に係る判別方法は、葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する判別方法であって、葉たばこを、メタノ

ール、エタノールもしくは水またはこれらの混合液に浸漬して、当該葉たばこの抽出液を得る抽出工程と、上記抽出液とフォーリン・チオカルト試薬と塩基とを混合して発色させる発色工程と、上記発色工程で得られた反応液における発色に基づき、上記葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する判別工程とを含む判別方法である。

### 発明の効果

[0011] 本発明によって、1つの葉たばこについて、その種類がバーレー種であるか否かを簡便かつ迅速に判別することができる。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例における、発色の結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0013] 本発明に係る判別方法について説明すれば以下の通りである。

[0014] 本発明に係る判別方法は、葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する判別方法であって、

葉たばこを、メタノール、エタノールもしくは水またはこれらの混合液に浸漬して、当該葉たばこの抽出液を得る抽出工程と、

上記抽出液とフォーリン・チオカルト試薬と塩基とを混合して発色させる発色工程と、

上記発色工程で得られた反応液における発色に基づき、上記葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する判別工程とを含む。

[0015] 本発明に係る判別方法の対象となる葉たばこの形態は、特に限定されず、例えば、原料の葉たばこのラミナ（除骨葉部分）であってもよいし、ラミナを刻んだたばこ刻であってもよいし、粉末状であってもよい。また、たばこ刻は、たばこ製品に含まれているものでもよいし、原料の葉たばこまたはたばこ製品の製造途中における葉たばこを刻んで用意したものでもよい。好ましくは、葉たばこは、たばこ刻または粉末状である。本発明に係る判別方法は、特にたばこ製品に含まれているたばこ刻に好適に適用され得る。

[0016] 本発明に係る判別方法では、1つの葉たばこについて、その種類がバーレー

一種であるか否かを判別する。バーレー種でないと判別された葉たばこは、例えば、黄色種、オリエント種、在来種などバーレー種以外の種類である。

[0017] なお、本明細書において「葉たばこ」とは、たばこ製品に含まれているたばこの葉、およびたばこ製品を製造するための原料となるたばこの葉（乾燥済みの葉）を指す。葉たばこの大きさは特に限定されないが、例えば、幅が0.1～1.5 mm、長さが0.5～10 mmのたばこ刻であり得る。

[0018] また、本明細書において「葉たばこの種類」とは、バーレー種、黄色種、オリエント種、および在来種などを指す。

[0019] 本発明に係る判別方法の各工程の詳細を説明する。

[0020] （抽出工程）

抽出工程は、対象とする葉たばこを、メタノール、エタノールもしくは水またはこれらの混合液に浸漬して、当該葉たばこの抽出液を得る工程である。

[0021] 葉たばこをメタノールと水との混合液に浸漬する場合、メタノールの濃度は、10%（v/v）以上で100%（v/v）未満であることが好ましく、70%（v/v）以上で99%（v/v）以下であることがより好ましい。また、葉たばこをエタノールと水との混合液に浸漬する場合、エタノールの濃度は、10%（v/v）以上で100%（v/v）以下であることが好ましく、70%（v/v）以上で99%（v/v）以下であることがより好ましい。葉たばこを、メタノールと水との混合液またはメタノールに浸漬することが好ましく、メタノールが80%（v/v）であることがより好ましい。また、本工程で得られた抽出液を他の方法による分析にも利用する場合（すなわち、他の方法における抽出工程と共通化する場合）、当該他の方法を考慮して、本発明の抽出工程で用いる液体の組成を適宜選択し得る。なお、本発明の効果が得られる限り、メタノール、エタノールもしくは水またはこれらの混合液に、他の物質が含まれていてもよい。

[0022] メタノール、エタノールもしくは水またはこれらの混合液の体積は特に限定されないが、例えば、葉たばこの体積の10倍以上で10000倍以下で

あることが好ましく、500倍以上で2000倍以下であることがより好ましい。

[0023] 浸漬する時間は特に限定されないが、例えば、5分以上で12時間以内であり、1時間以上で5時間以内であることが好ましく、2時間以上で3時間以内であることがより好ましい。

[0024] 抽出工程の温度は特に限定されないが、1℃以上で40℃以下であることが好ましく、5℃以上で30℃以下であることがより好ましい。より簡便に行うという観点からは、室温であることが好ましい。

[0025] 対象とする葉たばこを上述の液体に浸漬することによって、葉たばこ中に含まれていた、当該液体に可溶性物質（フェノール類など）が溶出する。このようにして、葉たばこの抽出液を得ることができる。

[0026] （発色工程）

発色工程は、抽出工程で得られた抽出液とフォーリン・チオカルト試薬と塩基とを混合して発色させる工程である。

[0027] 発色工程で用いる抽出液の量は特に限定されない。抽出工程で得られた抽出液の全量を用いてもよいし、一部を用いてもよい。また、抽出液は希釈して用いてもよいが、希釈せずに用いることもできる。簡便性の観点からは、抽出液は希釈せずに用いることが好ましい。

[0028] フォーリン・チオカルト試薬（F o l i n - C i o c a l t e u 試薬、以下「F C 試薬」という）は、タングステン酸二ナトリウム、モリブデン酸ナトリウム、硫酸リチウム、リン酸、塩酸および臭素の混合水溶液である。F C 試薬は、フェノールの検出にも用いられるため、フェノール試薬とも称される。F C 試薬は、フェノール性水酸基と反応すると青紫色に発色する。

[0029] 本発明において、F C 試薬は、市販のものを用いてもよいし、自ら調製したものをを用いてもよい。F C 試薬の量は特に限定されないが、例えば、発色工程で用いる抽出液の1倍以上で100倍以下であり、1倍以上で30倍以下であることが好ましい。また、F C 試薬は希釈してもよいが、原液のまま用いることもできる。簡便性の観点からは、F C 試薬は原液のまま用いるこ

とが好ましい。

[0030] 塩基は特に限定されないが、例えば、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、炭酸カリウム、または炭酸ナトリウムなど、F C法において一般的に用いられる塩基が挙げられる。塩基は水溶液として添加すればよい。

[0031] 塩基の量は特に限定されないが、例えば、1 Mの塩基を、用いる抽出液の体積とF C試薬の体積との合計の10倍以上で50倍以下の量を用いればよい。

[0032] 抽出液とF C試薬と塩基とを混合する順序は、特に限定されない。抽出液とF C試薬との混合液に塩基を添加してもよいし、抽出液と塩基との混合液にF C試薬を添加してもよいし、F C試薬と塩基との混合液に抽出液を添加してもよい。

[0033] 発色させる時間は特に限定されないが、退色を防ぐ観点から、例えば、1秒以上で60分以内であり、1秒以上で20分以内であることが好ましく、1秒以上で10分以内であることがより好ましい。

[0034] 発色工程の温度は特に限定されないが、1℃以上で40℃以下であることが好ましく、5℃以上で30℃以下であることがより好ましい。より簡便に行うという観点からは、室温であることが好ましい。

[0035] 抽出工程で得られた抽出液にフェノール類が含まれている場合には、当該フェノール類とフォーリン・チオカルト試薬とが反応し、反応液が青紫色に発色する。

[0036] (判別工程)

判別工程は、発色工程で得られた反応液における発色に基づき、対象の葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する工程である。

[0037] 後述する実施例に示されるように、黄色種およびオリエント種などのバーレー種以外の種類の葉たばこでは、青紫色に発色する。一方、バーレー種の葉たばこでは、基本的に青紫色に発色しない。したがって、発色工程で得られた反応液において、青紫色の発色が認められない場合、対象の葉たばこの種類はバーレー種であると判定できる。一方、発色工程で得られた反応液に

において、青紫色の発色が認められる場合、対象の葉たばこの種類はバーレー種ではないと判定できる。バーレー種ではないと判定された葉たばこは、例えば、黄色種、オリエント種、および在来種などのバーレー種以外の種類である。なお、バーレー種においてわずかに青紫色に発色する場合もあるが、非常に弱い発色であるため、当業者はバーレー種以外の種類における発色と容易に区別し得る。

[0038] 後述する実施例に示されるように、バーレー種とそれ以外の種類とでは、青紫色の発色の強度が大きく異なる。そのため、肉眼による観察に基づいて、対象の葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別し得る。すなわち、判別工程において、青紫色の発色は肉眼で確認し得る。肉眼で確認して判別を行えば、より簡便な判別を実現することができる。

[0039] より正確に判別を行うために、種類が既知の葉たばこにおける発色の強度を基準として、対象の葉たばこにおける発色の強度と比較してもよい。例えば、バーレー種であることが既知の葉たばこおよびそれ以外の種類（例えば、黄色種およびオリエント種など）であることが既知の葉たばこを基準とすればよい。基準となる青紫色の発色の強度は、抽出工程および発色工程における種々の条件によって異なる。そのため、対象の葉たばこ種類が既知の葉たばこを並行して分析することが好ましい。

[0040] さらに正確に判別を行うために、分光光度計を用いて380nm～495nm付近の吸光度を測定してもよい。例えば、96穴のマイクロプレートを用いて発色工程を行っている場合、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定することができる。吸光度を測定する場合、吸光度が基準値未満である場合に、対象の葉たばこの種類をバーレー種であると判定する。基準値は、種類が既知の葉たばこにおける吸光度に基づいて設定してもよいし、種類が既知の葉たばこにおける吸光度に基づくことなく設定してもよいし。バーレー種とそれ以外の種類とでは、青紫色の発色の強度が大きく異なるため、吸光度も大きく異なる。そのため、種類が既知の葉たばこにおける吸光度に基づくことなく、基準値を容易に設定し得る。

[0041] (本発明に係る判別方法の利点)

F C 試薬を用いる F C 法では、F C 試薬がフェノール性水酸基を有する物質に対して反応するため、一般的に、芳香族アミノ酸などの夾雑物の影響を非常に受けやすいという欠点があることが知られている。それゆえ、複雑なマトリックスを含む試料においては、フェノール性物質のみの有無の分析（定性）、または、フェノール性物質のみの定量を行うことはしない。複雑なマトリックスを含む試料中のフェノール性物質のみの定性または定量を行う場合、通常は、クロマトグラフィーまたは遠心分離などによって各成分に分離した後に F C 法を行う。

[0042] 特に葉たばこには多数の成分が含まれていることが知られており、抽出液を各成分に分離することが必須であると推察された。しかしながら、本発明者は、驚くべきことに、抽出液を各成分に分離することなく、F C 法により葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別可能であることを見出した。この発見に基づいてなされた本発明により、葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを簡便かつ迅速に判別することができる。

[0043] 本発明に係る判別方法は、さらに以下のような利点を有している。

[0044] 本発明に係る判別方法では、バーレー種とそれ以外の種類とで、青紫色の発色の差が大きく、肉眼によって十分にその発色の差が観察可能である。そのため、機器を用いて吸光度を測定しなくても、肉眼による観察で対象の葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを、高精度で判別することが可能である。そのため、より簡便かつ低コストで判別することができる。

[0045] また、本発明に係る判別方法では、抽出液および F C 試薬を希釈する必要がないため、短時間で行うことができる。

[0046] また、本発明に係る判別方法では、特別な試薬などを作製する必要がなく、また機器を用いることなく判別し得るため、低コストである。

[0047] また、本発明に係る判別方法では、抽出工程で用いる液体がメタノール、エタノールまたは水である。そのため、抽出工程後の葉たばこから、これら液体を蒸発させれば、同一の葉たばこを他の分析に再利用できる。特にこれ

ら液体に対して不溶な成分は、抽出されずに葉たばこ中に残存する。非特許文献 1 および非特許文献 2 に記載されているような DNA を抽出する方法では、対象のたばこ刻を破壊する必要がある、再利用することができない。

[0048] また、従来の DNA マーカーによる方法では、約 100 サンプルで 2～3 日程度かかる。一方、本発明に係る判別方法では、後述する実施例に示されるように、約 100 サンプルについて 4 時間以内に判別することができる。このように、本発明では判別するまでに要する時間が飛躍的に短縮され、迅速に判別することができる。

[0049] また、従来の DNA マーカーによる方法では、DNA の抽出および DNA マーカーの検出の手順が複雑であり、技術が必要である。一方、本発明の手順はシンプルであり、容易に行うことができる。

[0050] (本発明に係る判別方法の応用例)

たばこ製品の製造過程における葉組単位に含まれている葉たばこ、またはたばこ製品中に含まれている多数のたばこ刻を、本発明に係る判別方法を用いて分析すれば、当該葉組単位または当該たばこ製品におけるバーレー種の葉たばこの配合割合を算出することができる。

[0051] 以下に、たばこ製品におけるバーレー種の葉たばこの配合割合を、本発明に係る判別方法を用いて算出する方法の一例を説明する。

[0052] まず、たばこ製品中に含まれるたばこ刻をランダムに複数個（例えば、100 個）取り出す。各たばこ刻を 1500  $\mu$ L のチューブに入れ、80% ( $v/v$ ) エタノールを 150  $\mu$ L 入れて、2～3 時間室温に静置する。次いで、96 穴プレートの各ウェルに FC 試薬の原液を 10  $\mu$ L 入れる。各たばこ刻からの抽出液 10  $\mu$ L を、上記 96 穴プレートの各ウェルに入れる。さらに各ウェルに 1 M の KOH を 250  $\mu$ L 入れる。3 分後、各ウェルの発色を観察する。

[0053] 青紫色の発色が認められない場合、そのウェルのたばこ刻はバーレー種の葉たばこであると判定する。一方、青紫色の発色が認められる場合、そのウェルのたばこ刻はバーレー種の葉たばこではないと判定する。青紫色の発色

が認められないサンプルの個数を数え、当該個数を、分析した全たばこ刻の個数で割れば、たばこ製品におけるバーレー種の葉たばこの配合割合を算出することができる。

[0054] 上述のように、基準となる青紫色の発色の強度を決定するために、バーレー種およびそれ以外の種類であることが既知のたばこ刻（コントロール）に対しても、並行して上記と同様の操作を行ってもよい。例えば、たばこ製品がバーレー種、黄色種およびオリエント種のたばこ刻からなることがわかっている場合、バーレー種、黄色種およびオリエント種のたばこ刻をコントロールとして用いればよい。コントロールにおける青紫色の発色の強度に基づいて、バーレー種とそれ以外の種類との境界となる青紫色の発色の強度（基準）を決定し得る。

[0055] なお、より多くのたばこ刻を分析すれば、バーレー種の葉たばこの配合割合を、より高い精度で算出することができる。さらに他の分析方法と組み合わせれば、葉たばこの種類ごとの配合割合（葉組組成）を算出し得る。

[0056] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。

## 実施例

[0057] 種類が既知である（バーレー種、黄色種またはオリエント種）複数のたばこ刻を、下記の方法で分析した。これらのたばこ刻は、最終製品に含まれているものである。

[0058] <方法>

（１）各たばこ一刻（長さ 5 mm×幅 0.8 mm）を 1500  $\mu$ L のエッペンドルフチューブに入れ、80%（v/v）メタノールを 150  $\mu$ L 入れ

た。2～3時間室温に静置して、抽出を行った。

[0059] (2) 96穴マイクロプレートの各ウェルにフォーリン・チオカルト試薬（和光純薬工業（株）製、フォーリン&チオカルト，フェノール試薬）の原液を10 $\mu$ L入れた。

[0060] (3) 上記（1）で得られた各抽出液10 $\mu$ Lを、上記96穴マイクロプレートの各ウェルに入れた。各ウェルにおけるたばこの種類は下記の表1に示すとおりである。

[0061] (4) 各ウェルに1MのKOHを250 $\mu$ L入れた。

[0062] (5) 3分後、各ウェルの発色を肉眼で観察した。

[0063]

[表1]

| サンプル<br>No. | 種類および品種      | サンプル<br>No. | 種類および品種        | サンプル<br>No. | 種類および品種        |
|-------------|--------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| 1-A         | 外国黄色種・品種 a 1 | 5-A         | 外国バーレー種・品種 b 1 | 9-A         | オリエント種・品種 c 1  |
| 1-B         | 外国黄色種・品種 a 1 | 5-B         | 外国バーレー種・品種 b 2 | 9-B         | オリエント種・品種 c 2  |
| 1-C         | 外国黄色種・品種 a 1 | 5-C         | 外国バーレー種・品種 b 2 | 9-C         | オリエント種・品種 c 3  |
| 1-D         | 外国黄色種・品種 a 1 | 5-D         | 外国バーレー種・品種 b 3 | 9-D         | オリエント種・品種 c 4  |
| 1-E         | 外国黄色種・品種 a 2 | 5-E         | 外国バーレー種・品種 b 2 | 9-E         | オリエント種・品種 c 5  |
| 1-F         | 外国黄色種・品種 a 2 | 5-F         | 外国バーレー種・品種 b 3 | 9-F         | オリエント種・品種 c 6  |
| 1-G         | 外国黄色種・品種 a 2 | 5-G         | 外国バーレー種・品種 b 2 | 9-G         | オリエント種・品種 c 7  |
| 1-H         | 外国黄色種・品種 a 3 | 5-H         | 外国バーレー種・品種 b 3 | 9-H         | オリエント種・品種 c 6  |
| 2-A         | 外国黄色種・品種 a 4 | 6-A         | 外国バーレー種・品種 b 4 | 10-A        | オリエント種・品種 c 8  |
| 2-B         | 外国黄色種・品種 a 1 | 6-B         | 外国バーレー種・品種 b 3 | 10-B        | オリエント種・品種 c 9  |
| 2-C         | 外国黄色種・品種 a 2 | 6-C         | 外国バーレー種・品種 b 3 | 10-C        | オリエント種・品種 c 1  |
| 2-D         | 外国黄色種・品種 a 2 | 6-D         | 外国バーレー種・品種 b 3 | 10-D        | オリエント種・品種 c 1  |
| 2-E         | 外国黄色種・品種 a 2 | 6-E         | 外国バーレー種・品種 b 4 | 10-E        | オリエント種・品種 c 3  |
| 2-F         | 外国黄色種・品種 a 2 | 6-F         | 外国バーレー種・品種 b 3 | 10-F        | オリエント種・品種 c 2  |
| 2-G         | 外国黄色種・品種 a 1 | 6-G         | 外国バーレー種・品種 b 3 | 10-G        | オリエント種・品種 c 3  |
| 2-H         | 外国黄色種・品種 a 2 | 6-H         | 外国バーレー種・品種 b 3 | 10-H        | オリエント種・品種 c 10 |
| 3-A         | 国内黄色種・品種 a 5 | 7-A         | 国内バーレー種・品種 b 5 | 11-A        | オリエント種・品種 c 8  |
| 3-B         | 国内黄色種・品種 a 6 | 7-B         | 国内バーレー種・品種 b 6 | 11-B        | オリエント種・品種 c 10 |
| 3-C         | 国内黄色種・品種 a 7 | 7-C         | 国内バーレー種・品種 b 6 | 11-C        | オリエント種・品種 c 5  |
| 3-D         | 国内黄色種・品種 a 6 | 7-D         | 国内バーレー種・品種 b 6 | 11-D        | オリエント種・品種 c 10 |
| 3-E         | 国内黄色種・品種 a 5 | 7-E         | 国内バーレー種・品種 b 6 | 11-E        | オリエント種・品種 c 1  |
| 3-F         | 国内黄色種・品種 a 6 | 7-F         | 国内バーレー種・品種 b 6 | 11-F        | オリエント種・品種 c 10 |
| 3-G         | 国内黄色種・品種 a 6 | 7-G         | 国内バーレー種・品種 b 7 | 11-G        | オリエント種・品種 c 3  |
| 3-H         | 国内黄色種・品種 a 1 | 7-H         | 国内バーレー種・品種 b 7 | 11-H        | オリエント種・品種 c 11 |
| 4-A         | 国内黄色種・品種 a 6 | 8-A         | 国内バーレー種・品種 b 5 | 12-A        | オリエント種・品種 c 2  |
| 4-B         | 国内黄色種・品種 a 6 | 8-B         | 国内バーレー種・品種 b 6 | 12-B        | オリエント種・品種 c 3  |
| 4-C         | 国内黄色種・品種 a 6 | 8-C         | 国内バーレー種・品種 b 6 | 12-C        | オリエント種・品種 c 10 |
| 4-D         | 国内黄色種・品種 a 6 | 8-D         | 国内バーレー種・品種 b 7 | 12-D        | オリエント種・品種 c 1  |
| 4-E         | 国内黄色種・品種 a 6 | 8-E         | 国内バーレー種・品種 b 5 | 12-E        | オリエント種・品種 c 2  |
| 4-F         | 国内黄色種・品種 a 6 | 8-F         | 国内バーレー種・品種 b 6 | 12-F        | オリエント種・品種 c 4  |
| 4-G         | 国内黄色種・品種 a 8 | 8-G         | 国内バーレー種・品種 b 7 | 12-G        | オリエント種・品種 c 7  |
| 4-H         | 国内黄色種・品種 a 9 | 8-H         | 国内バーレー種・品種 b 7 | 12-H        | オリエント種・品種 c 12 |

## [0064] &lt;結果&gt;

上記（５）における各ウエルの写真を図１に示す。左側４列（黄色種）および右側４列（オリエント種）は、各３２ウエルの全てで青紫色に発色した。一方、中央４列（バーレー種）は、３２ウエル中２９ウエルで白色または黄色に発色し、３ウエルでわずかに青紫色に発色した。

[0065] 青紫色に発色していないサンプルをバーレー種の葉たばこであると判別した場合、バーレー種における判別確率は９０．６％であった。黄色種および

オリエント種における判別確率は100%であった。

[0066] このように、葉たばこを入手した国および品種によらず、バーレー種と、黄色種およびオリエント種とでは、青紫色の発色に明らかな差があった。

#### **産業上の利用可能性**

[0067] 本発明は、紙巻たばこの製造における品質管理に利用することができる。

### 請求の範囲

- [請求項1] 葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する判別方法であって、
- 葉たばこを、メタノール、エタノールもしくは水またはこれらの混合液に浸漬して、当該葉たばこの抽出液を得る抽出工程と、
- 上記抽出液とフォーリン・チオカルト試薬と塩基とを混合して発色させる発色工程と、
- 上記発色工程で得られた反応液における発色に基づき、上記葉たばこの種類がバーレー種であるか否かを判別する判別工程とを含む、判別方法。
- [請求項2] 上記抽出工程において、上記葉たばこを、メタノールと水との混合液またはメタノールに浸漬する、請求項1に記載の判別方法。
- [請求項3] 上記葉たばこは、たばこ刻または粉末状である、請求項1または2に記載の判別方法。

Figure 1 is a 96-well plate showing the effect of 100 μg/ml of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on cell growth. The plate has columns labeled 1-12 and rows labeled A-H. Columns 1-4 contain cells, columns 5-8 are empty, and columns 9-12 contain cells. Rows A-H show varying degrees of cell growth, with row A showing the most growth and row H showing the least.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/077636

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A24B3/16(2006.01) i, G01N31/22(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A24B3/16, G01N31/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 04-286924 A (Japan Tobacco Inc.),<br>12 October 1992 (12.10.1992),<br>entire text; all drawings<br>(Family: none)                                                                                                                         | 1-3                   |
| A         | Koki YOKOTSUKA, "Analytical Reversed-Phase<br>HPLC of Phenols Using the Folin-Ciocalteu<br>Method: Optimization of Conditions for Reaction<br>between Phenols and the Reagent", Journal of<br>ASEV JAPAN, 2001, vol.12, no.1, pages 21 to 28 | 1-3                   |
| A         | Jessada Denduangboripant et al, "Determination<br>of Local Tobacco Cultivars Using ISSR Molecular<br>Markaer", Chiang Mai J. Sci., 2010.05, 2010;<br>37(2), 293-303                                                                          | 1-3                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 January, 2013 (17.01.13)

Date of mailing of the international search report

29 January, 2013 (29.01.13)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））<br>Int.Cl. A24B3/16(2006.01)i, G01N31/22(2006.01)i                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））<br>Int.Cl. A24B3/16, G01N31/22                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの<br><div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>日本国実用新案公報</div> <div>1 9 2 2 - 1 9 9 6 年</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>日本国公開実用新案公報</div> <div>1 9 7 1 - 2 0 1 3 年</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>日本国実用新案登録公報</div> <div>1 9 9 6 - 2 0 1 3 年</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>日本国登録実用新案公報</div> <div>1 9 9 4 - 2 0 1 3 年</div> </div> |                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |
| 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）<br>WPI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |
| C. 関連すると認められる文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |
| 引用文献の<br>カテゴリー*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                       | 関連する<br>請求項の番号                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                 |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | JP 04-286924 A（日本たばこ産業株式会社）1992.10.12, 全文、全図。<br>（ファミリーなし）                                                                                              | 1 - 3                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                 |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 横塚弘毅, 「フォーリン・チオカルト法を用いた逆相系高速液体クロマトグラフィーによるフェノール化合物の分析ーフェノールとフォーリン・シオカルト試薬との反応条件の至適化」, Journal of ASEV JAPAN（日本ブドウ・ワイン学会誌）, 2001, Vol.12 No.1, pp. 21-28 | 1 - 3                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                 |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                         | の日の後に公表された文献<br>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |                                                                                                                                 |
| 国際調査を完了した日<br>1 7 . 0 1 . 2 0 1 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                         | 国際調査報告の発送日<br>2 9 . 0 1 . 2 0 1 3                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                 |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（I S A / J P）<br>郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                         | 特許庁審査官（権限のある職員）<br>杉山 豊博<br>電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 3 3 7                                                                                                                                                            | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">3 L</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">9 0 3 8</div> |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                           |                |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリ*        | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                         | 関連する<br>請求項の番号 |
| A                     | Jessada Denduangboripant et al, “Determination of Local Tobacco Cultivars Using ISSR Molecular Markaer”, Chiang Mai J. Sci., 2010.05, 2010;37(2), 293-303 | 1 - 3          |