



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A24B 15/24 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016124655, 18.12.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.12.2014

Дата регистрации:
02.11.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
18.12.2013 EP 13198191.2

(45) Опубликовано: 02.11.2018 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 18.07.2016

(86) Заявка РСТ:
EP 2014/078607 (18.12.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/091880 (25.06.2015)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ЛАНГ Герхард (CH),
ШАЙЕ Жан-Пьер (CH),
ВУЙАРНО Алин (CH)

(73) Патентообладатель(и):

ФИЛИП МОРРИС ПРОДАКТС С.А (CH)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2004021809 A1, 18.03.2004. WO
2005099493 A2, 27.10.2005. WO 0015056 A1,
23.03.2000.

**(54) СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СВЯЗАННОГО С МАТРИКСОМ
НИКОТИНПРОИЗВОДНОГО НИТРОЗАМИНКЕТОНА В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ ТАБАКА**

(57) Реферат:

Изобретение относится, в целом, к способам снижения количества никотинпроизводного нитрозаминкетона или 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридили)-1-бутанона (NNK) в растительном материале табака. Способ снижения количества связанного с матриксом NNK в сушеном растительном материале табака включает отделение лигнифицированной ткани от нелигнифицированной ткани, где количество лигнина снижают механическим путем, где

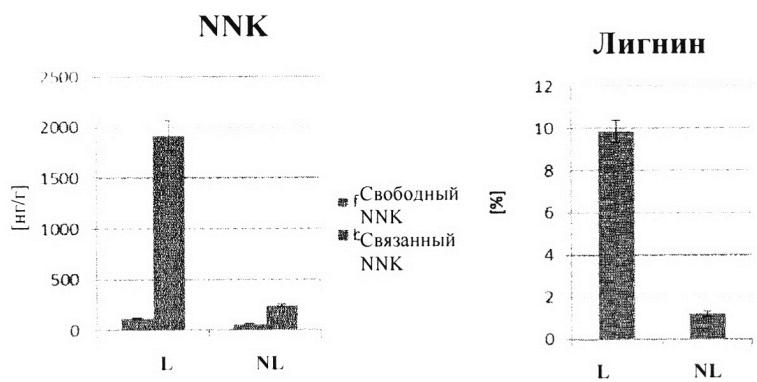
лигнифицированную ткань отделяют от нелигнифицированной ткани путем удаления сосудистого пучка, ксилемы или лигнифицированной склеренхимной ткани. Техническим результатом изобретения является эффективное снижение количества связанного с матриксом NNK в сушеном растительном материале табака. 10 н. и 5 з.п. ф-лы, 6 пр., 2 табл., 6 ил.

R U 2 6 7 1 6 1 6 C 1

R U 2 6 7 1 6 1 6 C 1

R U 2 6 7 1 6 1 6 C 1

R U 2 6 7 1 6 1 6 C 1



Фиг.1

RUSSIAN FEDERATION



(19)

RU (11)

2 671 616⁽¹³⁾ C1

(51) Int. Cl.

A24B 15/24 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A24B 15/24 (2006.01)

(21)(22) Application: **2016124655**, 18.12.2014

(24) Effective date for property rights:
18.12.2014

Registration date:
02.11.2018

Priority:

(30) Convention priority:
18.12.2013 EP 13198191.2

(45) Date of publication: **02.11.2018** Bull. № 31

(85) Commencement of national phase: **18.07.2016**

(86) PCT application:
EP 2014/078607 (18.12.2014)

(87) PCT publication:
WO 2015/091880 (25.06.2015)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, str.3, OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):

**LANG Gerkhard (CH),
SHAJE Zhan-Per (CH),
VUJARNO Alin (CH)**

(73) Proprietor(s):

FILIP MORRIS PRODAKTS S.A (CH)

R U
2 6 7 1 6 1 6 C 1

(54) METHODS FOR REDUCING MATRIX-BOUND NICOTINE-DERIVED NITROSAMINE KETONE IN TOBACCO PLANT MATERIAL

(57) Abstract:

FIELD: tobacco, cigars, cigarettes, smokables.

SUBSTANCE: invention generally relates to methods for reducing the amount of nicotine-derived nitrosamine ketone or 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in plant tobacco material. Method of reducing the amount of matrix bound NNK in a dried tobacco plant material includes separating lignified tissue from non-lignified tissue, where the

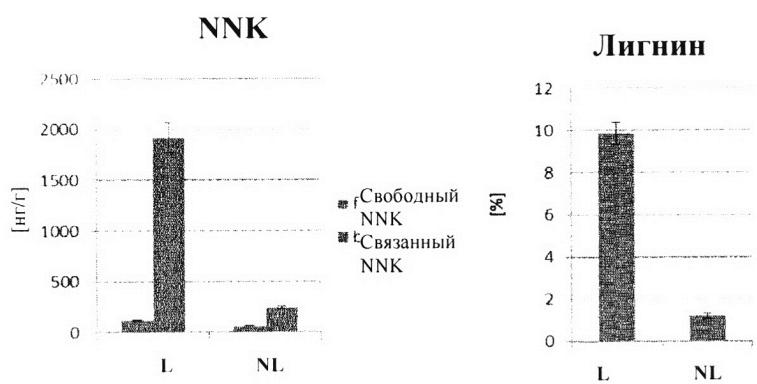
amount of lignin is reduced mechanically, where the lignified tissue is separated from the non-lignified tissue by removal of the vascular bundle, xylem or lignified sclerenchymatic tissue.

EFFECT: technical result of the invention is efficient reduction the amount of matrix-bound NNK in dried tobacco plant material.

15 cl, 6 ex, 2 tbl, 6 dwg

R U 2 6 7 1 6 1 6 C 1

R U 2 6 7 1 6 1 6 C 1



Фиг.1

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится, в целом, к способам снижения количества никотинпроизводного нитрозаминкетона или 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридинил)-1-бутанона (NNK) в растительном материале табака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В ходе изготовления и обработки табачных продуктов получают побочные продукты, такие как табачные стебли и отходы листьев. Табачные стебли и мелкие частицы табака, получаемые в ходе способов изготовления, не пригодны для непосредственного использования в изготовлении табачных продуктов. Поскольку стебли и мелкие частицы

отражены в значительной сумме денежных средств на сырье, были разработаны способы дополнительного преобразования этих стеблей и мелких частиц в такие продукты, как восстановленные табачные материалы (например, полотна из восстановленного табака), которые затем можно использовать в относительно больших количествах в смеси с приемлемым переработанным табачным листом. Восстановленный табак может быть изготовлен посредством способа, предусматривающего получение пульпы или получение полотен посредством отлива, в котором волокнистую массу из размятых табачных стеблей и других частей табачного листа измельчают и смешивают с раствором, который может содержать различные добавки. Полученную в результате табачную пульпу затем распыляют с образованием гонкой пленки, высушивают, вальцовывают и разрезают на полоски, которые добавляют в наполнитель.

Нитрозамины представляют собой органические соединения, встречающиеся во многих потребительских товарах, таких как табак, продукты питания и косметические средства. Нитрозамины вызвали большой научный интерес, поскольку некоторые из соединений этого класса, как было показано на лабораторных животных, являются канцерогенными. Сообщалось, что некоторые разновидности сушеного табака содержат специфические для табака нитрозамины, которые могут обнаруживаться в бездымном табаке, основном дыме и боковом дыме сигарет. В табаке по меньшей мере четыре вида нитрозаминов образуются в значительном количестве. Они представляют собой никотинпроизводный нитрозаминкетон или 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридинил)-1-бутанон (NNK), N-нитрозонорникотин (NNN), N-нитрозоанабазин (NAT) и N-нитрозоанабазин (NAB). Специфические для табака нитрозамины, как полагают, не присутствуют в значительных количествах в растущих табачных растениях или свежем резаном табаке (зеленом табаке), но образуются в ходе способа сушки табака. Помимо образования специфических для табака нитрозаминов в ходе способа сушки зеленых листьев, специфические для табака нитрозамины также могут образовываться в ходе способов, применяемых для получения водных табачных пульп, таких как способы, применяемые для получения восстановленного табака.

В попытке снизить количество специфических для табака нитрозаминов были предложены различные виды обработки растений табака или собранных табачных листьев, в том числе виды обработки облучением, химической обработки и экстракции. Другие способы снижения количества специфических для табака нитрозаминов были предложены в MacKown et al. (1988) J. Agric. Food Chem. 36, 1031-1035. Эти способы включают обработку с применением стерилизации, ингибиторов микроорганизмов, оснований для увеличения pH или аскорбиновой кислоты для уменьшения накопления специфических для табака нитрозаминов в ходе изготовления полотен из восстановленного табака. В WO 2012160133 описан способ снижения уровней специфических для табака нитрозаминов в табачных гомогенатах путем увеличения их pH, в особенности, когда повышенные уровни нитрозаминов обусловлены

повышенными уровнями нитритов.

Одна из проблем при попытке снизить уровни специфических для табака нитрозаминов в табаке заключается в том, что некоторые из нитрозаминов в табаке воздушной сушки, включая NNK, находятся в связанной или связанной с матриксом форме, удаление или экстракция которой могут быть затруднительными. Связанный с матриксом NNK можно экстрагировать с помощью 0,1 н. раствора KOH из промытого водой наполнителя Burley. Такая щелочная обработка также снижает уровни NNK в дыме (Keene, C.K., 1992, The Effect of Base Digestion on TSNA in Extractables-Depleted Fillers. Legacy Tobacco Documents). Однако в результате обработки в табаке могут быть внесены соединения, значимые с точки зрения токсикологии, и может значительно ухудшаться качество табака, что является существенной проблемой для табачной промышленности.

В WO 2010/021809 описан способ снижения количества азотсодержащих соединений и лигнина в табаке. Азотсодержащие соединения удаляют с помощью экстракции растворителем; лигнин удаляют на отдельной стадии.

Существует потребность в эффективном и экономически выгодном способе снижения количества связанного с матриксом NNK, который образуется в ходе сушки табака. В частности, особенно желательным является экономически выгодный и простой способ снижения уровней связанного с матриксом NNK в сушеном табаке, который не обуславливает внесение токсичных или потенциально токсичных соединений и не ухудшает качество табачного продукта.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение по меньшей мере частично основано на неожиданном обнаружении, что связанный с матриксом NNK колокализован с лигнином в растениях табака. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что в составе сушеных частей растения табака, таких как стебли и средние жилки, связанный с матриксом NNK колокализован, или колокализован преимущественно, или колокализован исключительно с лигнином, как например, в лигнифицированной ткани, в частности, в сосудистом пучке (например, ксилеме), но не в окружающих тканях, таких как корковый слой. Таким образом, с помощью удаления лигнина (например, путем отделения лигнифицированной ткани от нелигнифицированной) можно снижать количество связанного с матриксом NNK и его метаболитов в растительном материале. Связанный с матриксом NNK может быть связан с лигнином ковалентно или нековалентно. Ожидается, что растительный материал будет производить дым со сниженными уровнями NNK и потенциально улучшенными органолептическими свойствами. Настоящее раскрытие может быть применимо к таким растительным материалам, которые накапливают связанный с матриксом NNK или потенциально могут накапливать связанный с матриксом NNK. В частности, настоящее раскрытие может быть применимо к малоценному растительному материалу, содержащему связанный с матриксом NNK, который применяют в определенных способах переработки табака. Описанные в данном документе способы можно осуществлять без применения каких-либо добавок, и, таким образом, они не предусматривают внесение в растительный материал дополнительных соединений, значимых с точки зрения токсикологии. Удаление лигнина можно выполнять во время или после сушки растительного материала табака. Лигнин можно удалять до сушки с целью предотвращения, уменьшения или ингибирования колокализации связанного с матриксом NNK с лигнином.

Одной основной целью настоящего раскрытия является значительное снижение количества связанного с матриксом NNK и его метаболитов в табаке, предназначенном

для курения или потребления другим образом. Другой основной целью является снижение канцерогенного потенциала табачных продуктов, включая сигареты, сигары, жевательный табак, нюхательный табак, а также табакосодержащие жевательную резинку и пастилки. Еще одной основной целью является снижение или уменьшение количества связанного с матриксом NNK и его метаболитов в растительном материале табака и в табачных продуктах. Другой основной целью является снижение количества связанного с матриксом NNK и его метаболитов в сушеном, как, например, частично или полностью сушеном, растительном материале табака. Другой основной целью является снижение количества NNK и его метаболитов в аэрозоле, включая дым. Еще одной целью настоящего раскрытия является снижение количества NNK или его метаболитов у людей, которые курят, потребляют или иным образом принимают внутрь табак в какой-либо форме, путем получения пригодного для потребления человеком табачного продукта, содержащего сниженное количество NNK или его метаболитов, что, таким образом, приводит к снижению канцерогенного потенциала такого продукта.

Согласно одному аспекту предусматривается способ снижения количества связанного с матриксом NNK в сушеном растении табака или в сушеном растительном материале табака, включающий снижение в нем количества лигнина путем отделения лигнифицированной ткани от нелигнифицированной, где количество лигнина предпочтительно снижают химическим и/или механическим путем.

В одном варианте осуществления растение табака или растительный материал табака обрабатывают с целью расширения нелигнифицированной растительной ткани. Количество лигнифицированной ткани снижают путем разделения расширенной и нерасширенной растительной ткани на основании различных показателей их плотности (например, показателей плавучей плотности), и/или различных показателей их прочности, и/или их различных размеров, и/или их различного веса. Расширенную растительную ткань можно собирать для последующей переработки табака.

Было обнаружено, что значительного снижения уровней NNK и связанных TSNA можно достичь с помощью фракционирования лигнифицированных тканей. Отдельная химическая экстракция азотистых соединений и/или лигнина не является необходимой.

В одном варианте осуществления количество лигнина снижают путем удаления сосудистого пучка, или ксилемы, или лигнифицированной склеренхимной ткани, или комбинации двух или более из них из растения или растительного материала. Лигнин может быть локализован в сосудистом пучке. Лигнин может быть локализован исключительно в сосудистом пучке. Лигнин может быть локализован исключительно в ксилеме. Лигнин может быть локализован исключительно в склеренхимной ткани. Лигнин может быть локализован исключительно в склеренхимной ткани. В наружном слое средних жилок растений лигнифицированная ткань, как правило, отсутствует.

В одном варианте осуществления растение или растительный материал, который обрабатывают в соответствии с настоящим раскрытием, содержит средние жилки растений, или стебли растений, или черешки растений, или комбинацию двух или более из них, или состоит из них, или состоит главным образом из них.

В одном варианте осуществления количество лигнина снижают путем извлечения из растения или растительного материала коркового слоя, например, наружного коркового слоя.

В одном варианте осуществления способа включает стадии: (а) получения сущеного растения табака или сущеного растительного материала табака; (б) снижения количества лигнина в сущеном растении табака или сущеном растительном материале табака путем фракционирования растительного материала табака и (с) получения сущеною растения

5 табака или сущеного растительного материала табака, в котором количество лигнина снижено и количество связанного с матриксом NNK снижено по сравнению с сущеным растением табака или сущенным растительным материалом табака, получаемым на стадии (а).

В одном варианте осуществления за стадией (а) следует дополнительная стадия

10 измерения количества свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинации, и при этом за стадией (б) необязательно следует дополнительная стадия измерения количества свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинации.

В одном варианте осуществления способа включает дополнительную стадию (д)

15 сравнения уровня по меньшей мере связанного с матриксом NNK, измеряемого после стадии (а), с уровнем NNK, измеряемым после стадии (б), где снижение количества связанного с матриксом NNK в табачном материале, получаемом на стадии (б), по сравнению с табачным материалом, получаемым на стадии (а), указывает на то, что количество связанного с матриксом NNK в табачном материале снижено.

20 Согласно дополнительному аспекту предусматривается способ снижения образования связанного с матриксом NNK в ходе сушки растения табака или растительного материала табака, включающий снижение в нем количества лигнина до сушки.

25 В одном варианте осуществления способа включает стадии: (а) получения несущеного растения табака или несущеного растительного материала табака; (б) снижения количества лигнина в несущеном растении табака или несущеном растительном материале табака до сушки; (с) сушки растения табака или растительного материала табака, получаемого на стадии (б); и (д) получения сущеного растения табака или сущеного растительного материала табака, в котором количество связанного с матриксом NNK снижено по сравнению с контролем, в котором количество лигнина 30 не было снижено.

35 В одном варианте осуществления за стадией (а) следует дополнительная стадия измерения количества свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинации, и при этом за стадией (б) необязательно следует дополнительная стадия измерения количества свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинации, и при этом за стадией (с) необязательно следует дополнительная стадия измерения количества свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинаций.

40 В одном варианте осуществления после стадии (с) или стадии (д) указанный способ включает дополнительную стадию сравнения уровня по меньшей мере связанного с матриксом NNK, измеряемого после стадии (а), с уровнем NNK, измеряемым после стадии (б) и/или стадии (с), при этом снижение количества связанного с матриксом NNK в табачном материале, получаемом на стадии (б) или стадии (с), по сравнению с табачным материалом, получаемым на стадии (а), указывает на то, что количество связанного с матриксом NNK в табачном материале снижено.

45 Согласно дополнительному аспекту предусматривается растительный материал табака, полученный или получаемый описанным(описанными) в данном документе способом(способами).

Согласно дополнительному аспекту предусматривается применение растения табака

или растительного материала табака, в котором количество лигнина было снижено по сравнению с контрольным растением табака или контрольным растительным материалом табака, для получения табака со сниженными уровнями связанного с матриксом NNK, где указанные уровни связанного с матриксом NNK снижены по сравнению с контролем.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается способ получения восстановленного табака, включающий стадии: (а) осуществления описанного (описанных) в данном документе способа (способов); (б) получения восстановленного табака из табачного материала, получаемого на стадии (а); и (с) необязательно включения восстановленного табака в состав табачного продукта.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается восстановленный табак, полученный или получаемый описанным в данном документе способом.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается способ получения табака для применения в качестве резаного табачного наполнителя, включающий стадии: (а) осуществления описанного(описанных) в данном документе способа(способов) и (б) вальцевания и нарезки табачного материала для применения в качестве резаного табачного наполнителя.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается сушеный растительный материал табака, имеющий сниженный уровень лигнина по сравнению с контрольным растительным материалом табака, в котором количество лигнина не было снижено, при этом количество связанного с матриксом NNK составляет приблизительно 3500 нг/г или менее.

В одном варианте осуществления средний размер частиц составляет более чем приблизительно 0,5 миллиметра.

В одном варианте осуществления количество свободного NNK составляет менее чем приблизительно 330 нг/г, где необязательно содержание NNN составляет менее чем приблизительно 1700 нг/г и где необязательно содержание никотина составляет менее чем приблизительно 2610 мкг/г.

В одном варианте осуществления сушеный растительный материал табака содержит корковый слой растения, как, например, наружный корковый слой растения, состоит из него или состоит главным образом из него.

В одном варианте осуществления в сушеном растительном материале табака сосудистый пучок или ксилема, или лигнифицированная склеренхимная ткань, или комбинация двух или более из них практически отсутствуют.

В одном варианте осуществления сушеный растительный материал табака содержит корковый слой растения, как, например, наружный корковый слой растения, состоит из него или состоит главным образом из него, а сосудистый пучок, или ксилема, или лигнифицированная склеренхимная ткань, или комбинация двух или более из них в нем практически отсутствуют.

В одном варианте осуществления сушеный растительный материал табака получают или можно получить из средних жилок растений, или стеблей растений, или черешков растений, или комбинации двух или более из них.

В одном варианте осуществления средний размер частиц составляет более чем приблизительно 0,5 миллиметра.

В одном варианте осуществления количество свободного NNK составляет менее чем приблизительно 330 нг/г.

В одном варианте осуществления содержание NNN составляет менее чем приблизительно 1700 нг/г.

В одном варианте осуществления содержание никотина составляет менее чем приблизительно 2610 мкг/г.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается табачный продукт или продукт из восстановленного табака, содержащий растительный материал или сушеный 5 растительный материал, описанный в данном документе, состоящий из него или состоящий главным образом из него.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается способ получения аэрозоля, в котором количество NNK снижено по сравнению с контрольным аэрозолем, включающий стадии: (а) получения сущеного растения табака или сущеного

10 растительного материала табака; (б) снижения количества лигнина в сущеном растении табака или сущеном растительном материале табака; (с) получения сущеного растения табака или сущеного растительного материала табака, в котором количество лигнина снижено и количество связанного с матриксом NNK снижено по сравнению с сущенным растением табака или сущенным растительным материалом табака, получаемым на 15 стадии (а); и (д) нагревания сущеного растения табака или сущеного растительного материала табака из стадии (с) с получением аэрозоля.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается способ получения аэrozоля, в котором количество NNK снижено по сравнению с контрольным аэrozолем, включающий стадии: (а) получения несущеного растения табака или несущеного

20 растительного материала табака; (б) снижения количества лигнина в несущеном растении табака или несущеном растительном материале табака до сушки; (с) сушки растения табака или растительного материала табака, получаемого на стадии (б); (д) получения сущеного растения табака или сущеного растительного материала табака, в котором количество связанного с матриксом NNK снижено по сравнению с контролем, в котором 25 количество лигнина не было снижено; и (е) нагревания сущеного растения табака или сущеного растительного материала табака из стадии (д) с получением аэrozоля.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается способ получения аэrozоля, в котором количество NNK снижено по сравнению с контрольным аэrozолем, включающий стадии: (а) получения табачного продукта или продукта из

30 восстановленного табака, содержащего растительный материал табака или сушеный растительный материал, полученный или получаемый описанными в данном документе способами, состоящего из него или состоящего главным образом из него; и (б) нагревания табачного продукта или продукта из восстановленного табака с получением аэrozоля.

35 Согласно дополнительному аспекту предусматривается аэrozоль, полученный или получаемый описанным(описанными) в данном документе способом(способами).

Согласно дополнительному аспекту предусматривается сушеный растительный материал табака, состоящий главным образом из коркового слоя растения табака, при этом количество связанного с матриксом NNK снижено, как описано в данном документе.

40 Согласно дополнительному аспекту предусматривается способ смешивания табака, в котором по меньшей мере два различных типа табака смешивают с получением табачной мешки, включающий стадии: (а) получения первого сущеного растительного материала табака и снижения в нем количества лигнина; (б) измерения содержания общего и/или связанного с матриксом NNK в первом сущеном растительном материале

45 табака и отбора сущеного растительного материала табака, в котором содержание общего и/или связанного с матриксом NNK снижено по сравнению с первым сущенным растительным материалом табака, получаемым на стадии (а); (с) получения второго сущеного растительного материала табака, имеющего более высокое содержание

общего и/или связанного с матриксом NNK, чем содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в первом сушеном растительном материале табака, получаемом на стадии (b), и необязательно измерения содержания общего и/или связанного с матриксом NNK во втором сушеном растительном материале табака; (d) смешивания первого и 5 второго сушеного растительного материала табака из стадий (b) и (c) и необязательно измерения содержания общего и/или связанного с матриксом NNK в смешанном растительном материале табака и (e) получения смешанного растительного материала табака, в котором содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в смешанном 10 растительном материале табака ниже, чем во втором сушеном растительном материале табака, получаемом на стадии (c), при этом необязательно стадии (a) и (b) осуществляют после стадии (c).

Согласно дополнительному аспекту предусматривается смешанный растительный материал табака, полученный или получаемый описанным (описанными) в данном документе способом(способами).

15 Каждый из вариантов осуществления, рассматриваемых выше, раскрыт в виде вариантов осуществления каждого из аспектов настоящего изобретения.

Предполагаются комбинации одного или нескольких вариантов осуществления.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 представляет собой график, на котором показано распределение свободного 20 NNK, связанного с матриксом NNK и лигнина в лигнифицированной (L) и нелигнифицированной (NL) ткани в сушеных средних жилках табака Burley или сушеных стеблях табака Burley.

Фигура 2 представляет собой поперечный разрез гидратированного сушеного стебля 25 табака Burley, на котором показана лигнифицированная (L) и нелигинфицированная (NL) ткань. Лигнифицированная ткань окрашена красным с помощью флуоресцина.

Фигура 3 представляет собой график, на котором показано распределение свободного NNK, связанного с матриксом NNK и лигнина в лигнифицированной (L) и 30 нелигнифицированной (NL) ткани зеленых средних жилок табака Burley после нитрозирования раствором нитрита натрия (1,5 мл (10 мг/мл в воде) в течение 4 часов при комнатной температуре со встряхиванием).

Фигура 4 представляет собой график, на котором показан свободный и связанный с матриксом NNK во фракциях после просеивания измельченных высушенных сублимацией стеблей растений табака Burley.

Фигура 5 представляет собой график, демонстрирующий корреляцию между 35 связанным с матриксом NNK и лигнином во фракциях после просеивания измельченных высушенных сублимацией стеблей растений табака Burley.

Фигура 6 представляет собой график, на котором приведена концентрация связанного с матриксом NNK (мкг/г) в склеренхимной ткани (S) и в наружных слоях средних жилок (NS) после нитрозирования и промывания зеленых средних жилок табака TN90. Также 40 приведены уровни псевдооксигеникотина (PON) (мкг/г) и никотина (мкг/г). Также приведены уровни связанного с матриксом NNK (нг/г) в лигнифицированных (CS) и нелигнифицированных (CNS) частях образца сушеного стебля коммерческого табака Burley. Также приведены уровни NNN (нг/г) и никотина (мкг/г).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

45 Используемым в данном документе техническим терминам и выражениям следует придавать значение, которое обычно применяется к ним в данной области биологии растений и молекулярной биологии. Все нижеследующие определения терминов применяют ко всему содержанию данного раскрытия.

Слово «содержащий» не исключает другие элементы или стадии, а формы единственного числа не исключают множественное.

Термины «значительно», «прилизительно», «примерно» и т.п. по отношению к параметру или значению, в частности, также определяют точный параметр или точное значение соответственно.

Термин «растение» относится к любому растению или любой его части на любой стадии его жизненного цикла или развития, а также к его потомству. В одном варианте осуществления растение представляет собой растение табака, которое относится к растению, принадлежащему к роду Nicotiana. Предпочтительные виды растения табака описаны в данном документе.

«Растительная клетка» относится к структурной и физиологической единице растения. Растительная клетка может находиться в виде протопласта без клеточной стенки, выделенной отдельной клетки или культивируемой клетки или быть представлена как часть более высокоорганизованной единицы, такой как, но без ограничения, растительная ткань, орган растения или целое растение. В одном варианте осуществления растительная клетка представляет собой клетку растения табака.

Термин «растительный материал» относится к любой части растения или смеси разных частей растения и включает без ограничения растительные ткани, отходы листьев, отходы зеленых листьев, стебли, табачную пыль, образующуюся в ходе переработки растений, и ломаные листовые пластинки, собираемые по мере созревания, а также их комбинации. В некоторых вариантах осуществления растительный материал будет содержать часть растения или смесь частей растения, содержащих лигнин, таких как средние жилки растений, или стебли растений, или черешки растений, или комбинация двух или более из них, или состоять из них, или состоять главным образом из них.

Растительный материал табака может находиться в форме переработанных частей или кусочков табака, несущего, сущеного или выдержанного табака в по сути природной форме листовой пластинки или стебля, в виде табачного экстракта или смеси вышеуказанной, например, смеси, в которой экстрагированная табачная волокнистая масса объединена с гранулированными сушеными и выдержаными листовыми

пластинками природного табака. Растительный материал может находиться в твердой форме, жидкой форме, в полужидкой форме, в измельченной форме, в размолотой форме, в просеянной форме или в форме частиц и т.п. или может быть иным образом обработан для уменьшения размера частиц. Растительный материал может находиться в форме гомогената, который был подвергнут гомогенизации, включающей без

ограничения нарезку или измельчение или их комбинацию. Гомогенат можно получать из целых растений или из смесей растительных компонентов, как например, из смеси частей растения, содержащих лигнин, например, средних жилок, или стеблей, или черешков, или комбинации двух или более из них, которые были подвергнуты гомогенизации. Растительный материал может находиться в форме пульпы, включающей

суспензию растительного материала или растительный гомогенат, в водном растворе или растворителе. Пульпа может представлять собой 5% (вес/объем), 10% (вес/объем), 15% (вес/объем), 20% (вес/объем), или 25% (вес/объем), или более концентрированную смесь растительного материала в водном растворе или растворителе. В одном варианте осуществления растительный материал представляет собой растительный материал,

который содержит лигнин, состоит из него или состоит главным образом из него, такой как лигнифицированная ткань. В одном варианте осуществления растительный материал представляет собой растительный материал, который содержит сосудистый пучок, состоит из него или состоит главным образом из него. В одном варианте осуществления

растительный материал представляет собой растительный материал, который содержит ксилему, состоит из нее или состоит главным образом из нее. В одном варианте осуществления растительный материал представляет собой растительный материал, который содержит лигнифицированную склеренхимную ткань, состоит из нее или

5 состоит главным образом из нее. В одном варианте осуществления растительный материал содержит средние жилки растений, или стебли растений, или черешки растений, или комбинацию двух или более из них, состоит из них или состоит главным образом из них. В одном варианте осуществления растительный материал представляет собой растительный материал табака.

10 Термин «табачный продукт» включает курительные изделия или изделия для курения и бездымные табачные продукты.

Термин «свободный NNK» относится к концентрации NNK, рассчитанной из содержания NNK в экстрактах, полученных путем экстрагирования указанного растительного материала водным(водными) буферным (буферными) раствором

15 (растворами) при комнатной температуре. Содержание свободного NNK в таких экстрактах можно определять с применением сверхэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (UPLC-MS/MS).

20 Термин «общий NNK» относится к концентрации NNK, рассчитанной после воздействия на экстракционные смеси в соответствии с описанными в данном документе способами (например, путем нагревания до приблизительно 130°C в течение

приблизительно 4 часов) и фильтрования аликвот экстрактов. Общее содержание NNK в таких экстрактах можно определять с применением UPLC-MS/MS.

25 Используемый в данном документе термин «связанный NNK» или «связанный с матриксом NNK» представляет собой разность между концентрациями «общего NNK» и «свободного NNK».

30 Термины «сниженное содержание лигнина», или «уменьшенное содержание лигнина», или «нелигнифицированный», или их грамматические варианты относятся к измеряемому количественному снижению количества лигнина в растении по сравнению с количеством лигнина в сравниваемом контрольном растении. Количественное снижение лигнина можно легко установить с помощью известных из уровня техники анализов, в том числе анализа для определения лигнина по Класону (Method in Enzymol, 161: 87-101 (1988)), анализа с применением ацетилбромида (Wood Sci. Technol., 22: 271-280 1988)) или фотометрического способа, основанного на дериватизации с помощью тиогликоловой кислоты (J. Chem. Ecol, 28, 2483-2501 (2002)). В нелигнифицированной ткани количество

35 лигнина снижено относительно сравниваемого контрольного растения, и количество лигнина может быть полностью, практически или частично удалено. В нелигнифицированной ткани выявляемое количество лигнина может присутствовать при условии, что имеет место измеряемое количественное снижение количества лигнина относительно сравниваемого контрольного растения, в котором количество лигнина

40 не было снижено. В нелигнифицированной ткани может отсутствовать возможность выявления какого-либо количества лигнина. Нелигнифицированная ткань может иметь содержание лигнина в растении или части растения, из которых его удаляют, составляющее менее 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от общего веса сухого вещества.

45 «Контрольное растение» или «контрольная растительная клетка» относится к растению или растительной клетке, таким как естественные или встречающиеся в природе растение или растительная клетка, с содержанием лигнина и/или содержанием NNK, с которым не были проведены манипуляции или модификации. Контрольный

растительный материал включает растительный материал, полученный, происходящий или получаемый из контрольного растения или контрольной растительной клетки или их комбинации. Контрольное растение или контрольная растительная клетка могут относиться к тому же типу растения или растительной клетки, например, к тому же 5 виду растения или растительной клетки, что и растение или растительная клетка, с которыми их сравнивают. Контрольное растение или контрольная растительная клетка могут соответствовать растению дикого типа или растительной клетке дикого типа.

Термины «снижать» или «уменьшать» или их грамматические варианты относятся к снижению на от приблизительно 10% до приблизительно 99% или снижению по 10 меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, но меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 100% или более содержания, количества или 15 активности.

Термин «ингибировать» или его грамматические варианты относятся к снижению на от приблизительно 98% до приблизительно 100% или снижению по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, в частности, на 100%, содержания, количества или активности.

20 Термин «повышать» или его грамматические варианты относятся к повышению на от приблизительно 5% до приблизительно 99% или повышению по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 25 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 100% или более содержания, количества или активности.

30 Термин «приблизительно» в контексте заданного цифрового значения или диапазона относится к значению или диапазону, которые находятся в пределах 20%, в пределах 10% или в пределах 5% от заданного значения или диапазона.

Термин «по меньшей мере часть» или его грамматические варианты включают по 35 меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% содержания, количества или активности.

40 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В целом, настоящее раскрытие можно применять по отношению к любой форме растительного материала табака, в котором NNK или его метаболиты или их комбинация могут образовываться или были образованы. В подходящем случае по меньшей мере часть NNK находится в связанной форме. По меньшей мере часть связанной с матриксом 45 формы колокализована с лигнином, как, например, в лигнифицированной ткани. Способы измерения свободного (свободных) нитрозамина (нитрозаминов) и связанного (связанных) с матриксом нитрозамина (нитрозаминов) хорошо известны из уровня техники и описаны в данном документе. Вкратце, можно отбирать аликовоты образцов

табака и можно анализировать содержание в них нитрозамина с применением сверхэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (UPLC-MS/MS). Как правило, один или несколько стандартов, соответствующих одному или нескольким нитрозаминам, количество которых определяют, будут включены в 5 аликовты образцов табака. Концентрация в образце, рассчитанная из экстрактов, соответствует концентрации «свободного (свободных) нитрозамина (нитрозаминов)» в образце. После обработки экстракционных смесей в соответствии со способами, описанными в данном документе (например, путем нагревания до приблизительно 130°C в течение приблизительно 4 часов) концентрации нитрозаминов можно снова 10 измерить с помощью UPLC-MS/MS. На основании этих значений можно рассчитать концентрацию «общего NNK» в образцах. Концентрация «связанного с матриксом NNK» представляет собой разность между концентрациями «общего NNK» и «свободного NNK».

Для табака было проведено много исследований, в особенности в отношении 15 специфических для табака нитрозаминов. Свежесобранные табачные листья называют «зеленым табаком», и они, как полагают, не содержат нитрозаминов, но зеленый табак не пригоден для потребления человеком. Способ сушки зеленого табака зависит от типа собранного табака. Например, табак Virginia дымовой сушки (светлый), как правило, высушивают дымовой сушкой, тогда как Burley и некоторые темные 20 разновидности обычно высушивают воздушной сушкой. Дымовая сушка табака, как правило, происходит на протяжении периода пяти-семи дней в отличие от одного-двух месяцев воздушной сушки. Множество важных химических и биохимических изменений происходит в ходе способа сушки и продолжается на ранних фазах собственно сушки листа. Изменение цвета табака с желтого на коричневый обычно приводит в результате 25 к образованию и значительному накоплению нитрозаминов, в том числе NNK, и повышенному содержанию микроорганизмов. Точный механизм, посредством которого образуются специфические для табака нитрозамины, в том числе NNK, не ясен, но, как полагают, он интенсифицируется благодаря активности микроорганизмов, предусматривающей участие нитратредуктаз микроорганизмов в образовании нитритов 30 в ходе способа сушки.

Как описано выше, было обнаружено, что связанный с матриксом NNK колокализован с лигнином в растениях табака или в растительном материале табака. Лигин является общим термином для большой группы ароматических полимеров, образующихся в результате комбинаторного окислительного сочетания 4-35 гидроксифенилпропаноидов. Эти полимеры накапливаются преимущественно в клеточных стенках клеток со вторичным утолщением, как, например, в волокнах и сосудистых элементах, что делает их жесткими и непроницаемыми. Механическая жесткость, обусловленная лигнином, делает эти ткани прочными, так что сосудистые элементы могут выдерживать отрицательное давление, создаваемое в процессе 40 транспирации, без потери устойчивости ткани. Кроме обеспечения механической прочности, лигин обладает защитными функциями. Например, физическая прочность и химическая устойчивость лигнина могут препятствовать поеданию травоядными животными. Лигнификация является обычным ответом на инфекцию или ранение, который может обеспечить физический барьер с целью блокировки проникновения 45 патогенных микроорганизмов. Основными структурными элементами лигнина являются гидроксикоричные спирты (или монолигнолы), конифериловый спирт и синапиловый спирт, при этом количества n-кумарилового спирта, как правило, являются незначительными. Монолигнолы синтезируются из Phe общими путями, специфичными

- для фенилпропаноидов и монолигнолов. Рхе образуется в пластидах через шикиматный метаболический путь биосинтеза. Некоторые ферменты, вовлеченные в метаболический путь биосинтеза лигнина, а именно ферменты системы цитохрома P450 4-гидроксилаза коричной кислоты (C4H), n-кумарат-3-гидроксилаза (C3H), и ферулат-5-гидроксилаза (F5H), являются мембранными белками, которые, как полагают, активны на цитозольной стороне эндоплазматического ретикулума. Несмотря на то, что было показано образование метаболических каналов между фенилаланин-аммиак-лиазой (PAL) и C4H, остается неизвестным, являются ли также и ферменты других метаболических путей частью метаболических комплексов в пределах эндоплазматического ретикулума.
- 10 Структурные единицы, происходящие из монолигнолов, будучи включенными в лигниновый полимер, называются гвайцильными (G), сирингильными (S), и n-гидроксифенильными (H) структурными единицами.

Лигнин обычно находится, например, в средних жилках растений, стеблях растений или черешках растений. Таким образом, материал для применения в соответствии с настоящим раскрытием может включать средние жилки растений, или стебли растений, или черешки растений, или их смесь, или комбинацию двух или более из них, и может быть удален. Лигнин локализован, например, в сосудистом пучке растения табака, который может находиться в средних жилках растений, стеблях растений, черешках растений и т.п. Сосудистый пучок состоит из множества относительно жестких структурных элементов из целлюлозы, плотно соединенных между собой посредством волокнистой соединительной растительной ткани. Этот сосудисто-волокнистый пучок окружает корковый слой, образованный относительно губчатой растительной тканью, или покров, который составляет большую часть стебля и часть, которая по характеристикам и свойствам близка к пластинке табачного листа. Лигнин, как правило, локализован в сосудистом пучке. Сосудистый пучок представляет собой часть транспортной системы сосудистых растений. Транспорт как таковой происходит в сосудистой ткани, которая существует в двух формах, в виде ксилемы и флоэмы. Обе эти ткани присутствуют в сосудистом пучке, который, кроме того, будет включать опорные и защитные ткани. Из этих сосудистых тканей лигнин может находиться только в ксилеме.

Количество лигнина может быть значительно снижено в средних жилках растений, стеблях растений или черешках растений и т.п. или смеси или комбинации двух или более из них. Лигнин может быть практически удален из средних жилок растений, стеблей растений или черешков растений и т.п. или смеси или комбинации двух или более из них. В подходящем случае объем сосудистого пучка или ксилемы или их комбинации значительно снижен в средних жилках растений, стеблях растений или черешках растений и т.п. или смеси или комбинации двух или более из них. В подходящем случае сосудистый пучок или ксилема или их комбинация практически удалены из средних жилок растений, стеблей растений или черешков растений и т.п. или смеси или комбинации двух или более из них. В подходящем случае лигнифицированная склеренхимная ткань практически удалена из средних жилок растений, стеблей растений или черешков растений и т.п. или смеси или комбинации двух или более из них.

То, что связанный с матриксом NNK колокализован с лигнином, является преимуществом, поскольку лигнин можно легко отделить от других частей растения или других растительных тканей. В одном варианте осуществления количество лигнина снижено за счет отделения лигнифицированной ткани от нелигнифицированной. Например, наружный корковый слой можно легко отделить от сосудистого пучка, содержащего лигнин, с получением тем самым растительного материала со сниженными

уровнями лигнина. Растворимый материал, содержащий сниженные уровни лигнина или практически не содержащий лигнин, можно применять в изготовлении табачных материалов или табачных продуктов со сниженными уровнями связанного с матриксом NNK, как описано в данном документе. Необязательно, отделенный растворимый материал, содержащий лигнин, локализованный со связанным с матриксом NNK, можно выбрасывать или применять в других способах.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается способ снижения или уменьшения количества связанного с матриксом NNK в сушеном растении табака или в сушеном растворимом материале табака, включающий снижение в нем количества лигнина. Согласно этому способу предусматривается сушеное растение табака или сушеный растворимый материал табака. Количество лигнина в сушеном растении табака или сушеном растворимом материале табака снижено. Лигнин можно полностью удалять или частично удалять. Затем получают сушеное растение табака или сушеный растворимый материал табака, в котором количество лигнина снижено и количество связанного с матриксом NNK также снижено по сравнению с изначально полученным сушеным растением табака или сушеным растворимым материалом табака или по сравнению с контролем.

Лигнин, подлежащий полному или частичному удалению, может быть локализован в сосудистом пучке. Лигнин, подлежащий полному или частичному удалению, может быть локализован исключительно в сосудистом пучке. Лигнин, подлежащий полному или частичному удалению, может быть локализован исключительно в сосудистом пучке, но не в окружающей ткани. Таким образом, количество связанного с матриксом NNK в сушеном растении табака или в сушеном растворимом материале табака снижено благодаря снижению объема сосудистого пучка в сушеном растении табака или в сушеном растворимом материале табака.

Лигнин, подлежащий полному или частичному удалению, может быть локализован в ксилеме. Лигнин, подлежащий полному или частичному удалению, может быть локализован исключительно в ксилеме. Лигнин, подлежащий полному или частичному удалению, может быть локализован исключительно в ксилеме, но не в окружающей ткани. Таким образом, количество связанного с матриксом NNK в сушеном растении табака или в сушеном растворимом материале табака снижено благодаря снижению объема ксилемы в сушеном растении табака или в сушеном растворимом материале табака.

Лигнин, подлежащий полному или частичному удалению, может быть локализован в лигнифицированной склеренхимной ткани. Лигнин, подлежащий полному или частичному удалению, может быть локализован исключительно в лигнифицированной склеренхимной ткани. Лигнин, подлежащий полному или частичному удалению, может быть локализован исключительно в лигнифицированной склеренхимной ткани, но не в окружающей ткани, как, например, в наружном слое средних жилок. Таким образом, количество связанного с матриксом NNK в сушеном растении табака или в сушеном растворимом материале табака снижено благодаря снижению объема лигнифицированной склеренхимной ткани в сушеном растении табака или в сушеном растворимом материале табака.

Согласно другому аспекту предусматривается способ снижения, уменьшения, предотвращения или ингибирования образования связанного с матриксом NNK в ходе сушки растения табака или растворимого материала табака, включающий снижение в нем количества лигнина до сушки. По меньшей мере изначально растение табака или растворимый материал табака может быть несушеным или практически несушеным.

Способ можно применять для снижения, уменьшения, предотвращения или ингибирования колокализации NNK с лигнином, что в противном случае происходило бы в ходе последующего способа сушки. Согласно этому аспекту предусматривается несущеное растение табака, или несущеный растительный материал табака, или

- 5 практически несущеное растение табака, или практически несущеный растительный материал табака, при этом количество лигнина в нем снижают до сушки или в ходе сушки. Лигин может быть полностью удалить или частично удалить. Лигин может быть локализован в сосудистом пучке. Лигин может быть локализован исключительно в сосудистом пучке, или не в окружающей ткани. Таким образом, сосудистый пучок можно полностью удалить или частично удалить. Лигин может быть локализован в ксилеме. Лигин может быть локализован исключительно в ксилеме, но не в окружающей ткани. Таким образом, ксилему можно полностью удалить или частично удалить. Лигин может быть локализован в
- 10 15 лигнифицированной склеренхимной ткани. Лигин может быть локализован исключительно в лигнифицированной склеренхимной ткани. Лигин может быть локализован исключительно в лигнифицированной склеренхимной ткани, но не в окружающей ткани, как, например, в наружном слое средних жилок. Таким образом, лигнифицированную склеренхимную ткань можно полностью удалить или частично удалить. Лигин можно полностью удалить или частично удалить. После воздействия на растение табака или растительный материал табака сушки с применением известных из уровня техники способов можно получить сущеное растение табака или сущеный растительный материал табака, в котором количество связанного с матриксом NNK и количество лигнина снижено по сравнению с исходным материалом или по сравнению
- 20 25 с контролем.

Количество лигнина в растении табака или в растительном материале табака можно снизить с применением ряда способов, хорошо известных из уровня техники. Согласно одному способу партию стеблей и т.п. можно увлажнять или вымачивать в жидкости, например, воде, что вызывает размягчение и расширение или разбухание коркового слоя, при этом лигин остается в нерасширенном состоянии. Корковый слой можно удалить вручную (например, руками) и сохранять, а сосудистый пучок, содержащий лигин, можно выбрасывать или применять где-либо еще. Следовательно, корковый слой (например, наружный корковый слой) можно отделять от лигнифицированной ткани и сохранять, а нерасширенную лигнифицированную ткань выбрасывать. Корковый слой затем можно применять для последующей переработки табака. Также раскрыт корковый слой растения (например, наружный корковый слой растения) или расширенный корковый слой растения (например, расширенный наружный корковый слой растения), в котором количество связанного с матриксом NNK ниже выявляемых уровней. Следовательно, нелигнифицированную растительную ткань можно расширять с целью разделения лигнифицированной и нелигнифицированной ткани. В подходящем случае нелигнифицированная ткань избирательно или преимущественно расширена по сравнению с лигнифицированной тканью.

- 30 35 40 45 В качестве дополнительного примера лигин можно отделять с применением подходящего механизма для декортации. Декортатор представляет собой устройство для снятия коры, древесины и черешков растения и т.п.

В другом способе можно применять механическое разделение. Например, осуществляют вымачивание партии стеблей или т.п. с последующей сублимационной сушкой. В другом примере осуществляют вымачивание партии стеблей или т.п. с

последующими сублимационной сушкой, измельчением и просеиванием. В подходящем случае растительный материал табака можно измельчать с в порошкообразную форму с применением оборудования и технологий для измельчения, перемалывания и т.п. В подходящем случае растительный материал табака находится в относительно сухой форме в ходе измельчения или перемалывания с применением различного оборудования, такого как молотковые мельницы, режущие головки, мельницы с пневматическим управлением и т.п.

Растительный материал может быть уменьшен в размере с образованием частиц или материала в форме частиц с применением различных способов, известных из уровня техники. Частицы или материал в форме частиц можно разделять по размеру с получением фракций со сниженными уровнями лигнина и сниженными уровнями связанного с матриксом NNK. В одном подходящем способе растительный материал обрабатывают путем соударения, как, например, путем соударения с одним или несколькими объектами, более твердыми, чем подлежащий обработке растительный материал. В одном варианте осуществления применяют соударение с металлом, как, например, с металлическими шариками. Соударение можно обеспечивать различными способами, как, например, путем встряхивания. Например, растительный материал можно соударять со стальными шариками (2 стальных шарика, диаметр 2 см) со встряхиванием при 300 об./мин. в течение 15 минут. Частицы или материал в форме частиц можно разделять по размеру на фракции с разным размером частиц с применением встряхивателя для сит. В подходящем случае средний размер частиц составляет более чем приблизительно 0,5 миллиметра, более чем приблизительно 0,85 миллиметра или более чем приблизительно 1 миллиметр. Эти фракции по размеру могут характеризоваться сниженными уровнями лигнина и сниженными уровнями связанного с матриксом NNK.

Растительный материал можно измельчать или перемалывать, если содержание влаги в нем составляет от менее чем приблизительно 15 процентов по весу до менее чем приблизительно 5 процентов по весу. Растительный материал табака может быть тонкоизмельченным. Тонкоизмельченный табачный материал, как правило, характеризуется размером частиц от приблизительно 30 до 600 микрон.

В одном варианте осуществления способ включает расширение, например, путем приведения в контакт с жидкостью (например, путем вымачивания в воде), с последующей сублимационной сушкой, что будет приводить к расширению растительного материала, который не содержит лигнин или содержит только низкие уровни лигнина. Лигнифицированный растительный материал будет сохранять более высокую плотность, более высокую физическую прочность и меньший размер частиц, чем у расширенной растительной ткани, что, таким образом, обеспечивает возможность разделения по размеру. В другом варианте осуществления способ включает расширение с последующей сублимационной сушкой, за которой следует измельчение (например, путем соударения, обсуждаемого выше), за которым следует сортировка (например, сортировка по размеру) полученных фрагментов и отбор фрагментов со сниженными уровнями лигнина и сниженными уровнями связанного с матриксом NNK. Для этой цели можно применять просеивание. Согласно другому варианту осуществления способ включает расширение с последующим измельчением или размалыванием или их комбинацией (например, путем соударения, обсуждаемого выше), за которыми следуют сортировка по размеру (например, с применением просеивания или на основании плотности и/или механической прочности) полученных частиц и отбор частиц со сниженными уровнями лигнина и сниженными уровнями связанного с матриксом NNK.

Фракции с разным размером также могут различаться по содержанию в них свободного NNK, или содержанию в них NNN, или содержанию в них никотина, или комбинации двух или более из них.

После полного или частичного удаления лигнина растительный материал

- 5 необязательно можно подвергать последующей обработке для применения в табачном продукте. В качестве примера, этот материал можно получать в форме водной пульпы. Полученная пульпа может содержать значительную долю диспергированных в ней коллоидных частиц коркового слоя. Преобразование коркового слоя табака в водную пульпу можно осуществлять с применением мельницы подходящего типа, как, например,
- 10 шаровой мельницы или коллоидной мельницы. Последующая обработка коркового слоя и водной пульпы описана в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления растительный материал, полученный или получаемый описанными в данном документе способами, содержит ткань, окружающую сосудистый пучок, или ткань, окружающую ксилему, или ткань, окружающую

- 15 лигнифицированную склеренхимную ткань, или комбинацию двух или более из них, состоит из них или состоит главным образом из них, при этом сосудистый пучок, или ксилема, или лигнифицированная склеренхимная ткань, или комбинация двух или более из них практически отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления растительный материал содержит ткань, окружающую сосудистый пучок, или ксилему, или
- 20 лигнифицированную склеренхимную ткань, или комбинацию двух или более из них, состоит из них или состоит главным образом из них и практически не содержит сосудистый пучок, или ксилему, или лигнифицированную склеренхимную ткань, или комбинацию двух или более из них. В некоторых вариантах осуществления растительный материал содержит ткань, окружающую сосудистый пучок, или ксилему, или
- 25 лигнифицированную склеренхимную ткань, или комбинацию двух или более из них, состоит из них или состоит главным образом из них и не содержит сосудистый пучок, или ксилему, или лигнифицированную склеренхимную ткань, или комбинацию двух или более из них. В некоторых вариантах осуществления растительный материал содержит наружный корковый слой табака, состоит из него или состоит главным
- 30 образом из него. В некоторых вариантах осуществления растительный материал содержит наружные слои средних жилок растений, состоит из них или состоит главным образом из них.

Описанные в данном документе способы могут включать одну или несколько дополнительных стадий измерения и необязательно сравнения уровней свободного

- 35 NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинации. Способы измерения свободного NNK и связанного с матриксом NNK описаны в данном документе. В одном варианте осуществления количество свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинации определяют в сушеном растении табака или в сушеном растительном материале табака. После снижения количества лигнина в сушеном
- 40 растении табака или сушеном растительном материале табака количество свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинации можно измерять снова. Уровень по меньшей мере связанного с матриксом NNK. можно сравнивать с уровнем в изначальном исходном материале для определения того, был ли снижен уровень связанного с матриксом NNK. На этой стадии предварительно измеренный уровень по
- 45 меньшей мере связанного с матриксом NNK можно сравнивать с уровнем NNK, измеренным после снижения количества лигнина. Снижение количества связанного с матриксом NNK в табачном материале, полученном после снижения количества лигнина, по сравнению с изначально полученным табачным материалом указывает на то, что

количество связанного с матриксом NNK было снижено.

Описанные в данном документе способы могут включать одну или несколько дополнительных стадий измерения и необязательно сравнения уровней свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинаций. В одном варианте

- 5 осуществления количества свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинации измеряют в несущеном растении табака или в несущеном растительном материале табака. Необязательно, после снижения количества лигнина в несущеном растении табака или несущеном растительном материале табака до сушки количество свободного NNK или связанного с матриксом NNK или их комбинации можно измерять
- 10 снова. Способ может включать одну или несколько стадий сравнения. В качестве примера, способ может включать дополнительную стадию сравнения изначально измеренного уровня по меньшей мере связанного с матриксом NNK, как обсуждается выше, с уровнем NNK, измеренным позже, при этом снижение количества связанного с матриксом NNK в табачном материале по сравнению с изначально полученным
- 15 табачным материалом указывает на то, что количество связанного с матриксом NNK в табачном материале снижено.

Свободный NNK или связанный с матриксом NNK или их комбинацию можно измерить в начале осуществления способа, и/или в конце осуществления способа, и/или в ходе осуществления способа. Свободный NNK или связанный с матриксом NNK или 20 их комбинацию можно измерять периодически или с определенными интервалами. Интервалы могут представлять собой фиксированные интервалы или произвольные интервалы. Свободный NNK или связанный с матриксом NNK или их комбинацию можно измерять в конце осуществления способа с целью проверки того, присутствует ли свободный NNK или связанный с матриксом NNK или их комбинация в пределах 25 необходимого количества, концентрации или диапазона.

Лигнин может представлять собой ковалентно или нековалентно связанный лигнин. Описан комплекс, содержащий лигнин, связанный с NNK ковалентно или нековалентно. Также раскрыты растительная клетка, растительная ткань, или растение, или 30 растительный материал, содержащие данный комплекс. Также описан способ снижения количества связанного с матриксом NNK в сушеном растении табака или в сушеном растительном материале табака, включающий снижение в нем количества данного комплекса.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается сушеная растительная ткань, имеющая сниженный уровень лигнина по сравнению с контрольной растительной 35 тканью, в которой количество лигнина не было снижено, при этом количество связанного с матриксом NNK составляет приблизительно 3500 нг/г или менее. Количество связанного с матриксом NNK может составлять приблизительно 3000 нг/г или менее, приблизительно 2500 нг/г или менее, приблизительно 2000 нг/г или менее, приблизительно 2000 нг/г или менее, приблизительно 1500 нг/г или менее, 40 приблизительно 1000 нг/г или менее или приблизительно 500 нг/г или менее. В подходящем случае средний размер частиц этой сушеной растительной ткани может составлять более чем приблизительно 0,5 миллиметра, более чем приблизительно 0,85 миллиметра или более чем приблизительно 1 миллиметр. В подходящем случае количество свободного NNK в этой сушеной растительной ткани может составлять 45 приблизительно 330 нг/г или менее, приблизительно 300 нг/г или менее, приблизительно 250 нг/г или менее, приблизительно 200 нг/г или менее, приблизительно 150 нг/г или менее, приблизительно 100 нг/г или менее или приблизительно 50 нг/г или менее. В подходящем случае количество NNN в этой сушеной растительной ткани может

составлять приблизительно 1700 нг/г или менее, приблизительно 1500 нг/г или менее, приблизительно 1300 нг/г или менее, приблизительно 1100 нг/г или менее, приблизительно 1000 нг/г или менее или приблизительно 500 нг/г или менее. В подходящем случае количество никотина в этой сушеной растительной ткани может 5 составлять приблизительно 2600 мкг или менее, приблизительно 2300 мкг или менее или приблизительно 2100 мкг или менее. В подходящем случае количество лигнина в этой сушеной растительной ткани может соответствовать содержанию приблизительно 6,5% или менее от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани, содержанию приблизительно 6% от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани, 10 содержанию приблизительно 5% от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани, содержанию приблизительно 4% от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани или содержанию приблизительно 3% от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани.

В одном варианте осуществления предусматривается сушеная растительная ткань, 15 имеющая сниженный уровень лигнина по сравнению с контрольной растительной тканью, в которой количество лигнина не было снижено, при этом количество связанного с матриксом NNK составляет приблизительно 3500 нг/г или менее и средний размер частиц составляет приблизительно 0,5 мм или более. В подходящем случае количество свободного NNK составляет приблизительно 300 нг/г или менее. В подходящем случае 20 количество NNN составляет приблизительно 1700 нг/г или менее. В подходящем случае количество лигнина в этой сушеной растительной ткани соответствует содержанию приблизительно 6,4% или менее от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани. В подходящем случае количество никотина составляет приблизительно 2600 мкг или менее.

25 В другом варианте осуществления предусматривается сушеная растительная ткань, имеющая сниженный уровень лигнина по сравнению с контрольной растительной тканью, в которой количество лигнина не было снижено, при этом количество связанного с матриксом NNK составляет приблизительно 1900 нг/г или менее и средний размер частиц составляет от приблизительно 0,85 мм до приблизительно 1 мм. В 30 подходящем случае количество свободного NNK составляет приблизительно 250 нг/г или менее. В подходящем случае количество NNN составляет приблизительно 1270 нг/г или менее. В подходящем случае количество лигнина в этой сушеной растительной ткани соответствует содержанию приблизительно 4,4% или менее от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани. В подходящем случае количество никотина 35 составляет приблизительно 2300 мкг или менее.

В другом варианте осуществления предусматривается сушеная растительная ткань, имеющая сниженный уровень лигнина по сравнению с контрольной растительной тканью, в которой количество лигнина не было снижено, при этом количество связанного с матриксом NNK составляет приблизительно 1600 нг/г или менее и средний размер 40 частиц составляет более чем приблизительно 1 мм. В подходящем случае количество свободного NNK составляет приблизительно 200 нг/г или менее. В подходящем случае количество NNN составляет приблизительно 1100 нг/г или менее. В подходящем случае количество лигнина в этой сушеной растительной ткани соответствует содержанию приблизительно 3% или менее от общего веса сухого вещества сушеной растительной 45 ткани. В подходящем случае количество никотина составляет приблизительно 2100 мкг или менее.

Растение табака или растительный материал табака, применяемые в начале осуществления способа(способов), описанных в данном документе, могут содержать

несущеное растение табака, или несущеный растительный материал табака, или сущеное растение табака, или сущеный растительный материал табака, или состоять из них, или состоять главным образом из них. Способы сушки табака, как, например, табачных листьев, в частности, зеленых табачных листьев, хорошо известны специалистам в

5 данной области и включают без ограничения воздушную сушку, огневую сушку, дымовую сушку и солнечную сушку. Способ сушки табака зависит от типа собранного табака. Например, табак Virginia дымовой сушки (светлый), как правило, высушивают дымовой сушкой, Burley и некоторые темные разновидности обычно высушивают воздушной сушкой, а трубочный табак, жевательный табак и нюхательный табак

10 обычно высушивают огневой сушкой. Хотя можно использовать растения табака или растительный материал табака, принадлежащие к любому типу табака, определенные типы табака являются предпочтительными. Особенно предпочтительные табачные материалы выбраны из группы, состоящей из табака дымовой сушки, турецкого табака, табака Burley, табака Virginia, табака Maryland, восточного табака или любой

15 комбинации двух или более из них. Форма табачного материала, как правило, не ограничена. Он может быть в форме гомогенизированного табачного материала. Табачные гомогенаты, такие как, без ограничения, сущеные табачные гомогенаты, могут быть получены из табачного материала с помощью различных способов, известных из уровня техники, например, табак может быть в скрошенной,

20 гранулированной, измельченной или порошкообразной форме. В некоторых вариантах осуществления желательно не начинать с табачного материала в измельченной или порошкообразной форме, поскольку определенные способы механического разделения, которые можно применять для разделения лигнина, могут требовать стадий измельчения и/или просеивания.

25 Применяемый или получаемый табачный материал может содержать добавки, которые включают без ограничения один или несколько из следующих компонентов, а также их комбинации: ароматизаторы, органические и неорганические наполнители (например, зерно, обработанное зерно, вздутое зерно, мальтодекстрин, декстрозу, карбонат кальция, фосфат кальция, кукурузный крахмал, лактозу, маннит, ксилит,

30 сорбит, мелкодисперсную целлюлозу и т.п.), связующие вещества (например, повидон, натрий-карбоксиметилцеллюлозу и другие типы связующих веществ на основе модифицированной целлюлозы, альгинат натрия, ксантановую камедь, связующие вещества на основе крахмала, аравийскую камедь, лецитин и т.п.), красящие вещества (например, красители и пигменты, в том числе карамельное красящее вещество и диоксид

35 титана и т.п.), увлажняющие вещества (например, глицерин, пропиленгликоль и т.п.), добавки для ухода за полостью рта, консерванты (например, сорбат калия и т.п.), сиропы (например, мед, кукурузную патоку с высоким содержанием фруктозы и подобные продукты, используемые в качестве ароматизаторов) и добавки-разрыхлители (например, микрокристаллическую целлюлозу, кроскармеллозу натрия, кросповидон,

40 крахмалгликолят натрия, прежелатинизированный кукурузный крахмал и т.п.). Такие добавки известны специалистам в данной области и могут присутствовать в количествах и в формах, известных из уровня техники.

Табак можно получать в виде восстановленного табака. Таким образом, в одном варианте осуществления описанные в данном документе способы можно применять 45 для получения восстановленного табака, как, например, полотен восстановленного табака (листового). Эти полотна представляют собой бумагоподобный материал, который может быть получен из вторично используемых мелких частиц табака, табачных стеблей и «сортового табака», который состоит из частиц табака с размером

обычно менее 30 меш, собираемых на любой стадии переработки табака.

Восстановленный табак может быть получен путем экстрагирования растворимых химических веществ из побочных продуктов табачного производства, переработки оставшихся после экстракции табачных волокон в бумагу, а затем повторного нанесения

5 экстрагированных материалов в концентрированной форме на бумагу. Восстановленный табак, как правило, может быть получен различными путями. Например, в одном варианте осуществления для получения восстановленного табака можно применять ленточный отлив. При ленточном отливе, как правило, используют пульпу из мелкодисперсных частей табака и связующее вещество, которые наносят на стальную

10 ленту и затем высушивают. После сушки полотно смешивают с ломанным природным табаком или крошат и используют в различных табачных продуктах, в том числе в качестве сигаретного наполнителя. Некоторые примеры способов получения восстановленного табака описаны в US 3353541, US 3420241, US 3386449, US 3760815 и 4674519. Восстановленный табак может также быть получен с помощью способа

15 изготовления бумаги. Некоторые примеры способов получения восстановленного табака в соответствии с этим способом описаны в US 3428053, US 3415253, US 3561451, US 3467109, US 3483874, US 3860012, US 3847164, US 4182349, US 5715844, US 5724998 и US 5765570. Например, получение восстановленного табака с помощью технологий изготовления бумаги может включать стадии смешивания табака с водой,

20 экстрагирования из него растворимых ингредиентов, концентрирования растворимых ингредиентов, очистки табака, образования холста, повторного нанесения концентрированных растворимых ингредиентов, сушки и трепания. Различные ингредиенты, такие как ароматизирующие или красящие средства обработки, могут быть нанесены на холст.

25 Из табака, полученного или получаемого с помощью способов, описанных в данном документе, может быть получено табачное полотно, такое как полотно из восстановленного табака. В соответствии с этим вариантом осуществления способ может включать стадии: (а) получения табачного материала, такого как табачный гомогенат, в соответствии со способами, описанными в данном документе; (б) получения

30 пульпы табачного гомогената; (с) отлива пульпы табачного гомогената и (д) сушки пульпы табачного гомогената с образованием полотна из восстановленного табака. В соответствии с другим вариантом осуществления способ может включать стадии: (а) получения табачного материала, такого как табачный гомогенат, в соответствии со способами, описанными в данном документе, и получения табачной пульпы; (б) отлива

35 пульпы табачного гомогената и (с) сушки пульпы табачного гомогената с образованием табачного полотна.

Стадию отлива пульпы табачного гомогената можно осуществлять с применением любого из способов отлива или изготовления бумаги, известных из уровня техники. В качестве примера, способы отлива описаны в US 5724998 и US 5584306; способы

40 изготовления бумаги описаны в US 4341228; US 5584306 и US 6216706. Способы отлива, как правило, включают отлив пульпы на непрерывной конвейерной ленте из нержавеющей стали, сушки отлитой пульпы с образованием полотна из восстановленного табака и удаления указанного полотна. Способы изготовления бумаги, как правило, включают отлив водной пульпы из напорного ящика на проволочную сетку для образования желаемого полотна. Водная пульпа может быть разделена на растворимую часть и волокнистую часть. Из волокнистой части отводят воду, и образовавшееся таким образом полотно затем обрабатывают и высушивают.

Табачные пульпы могут дополнительно содержать одно или несколько связующих

веществ, таких как камеди и пектины. Как описано выше, табачные пульпы, которые применяют для получения полотен из восстановленного табака, могут дополнительно содержать обычные добавки, которые включают без ограничения один или несколько из следующих компонентов, а также их комбинации: волокна древесной целлюлозы, вещества, образующие аэрозоль, сахара, и ароматизаторы, и связующие вещества.

Добавки из перечня, описанного выше, известны специалистам в данной области и могут присутствовать в этих водных пульпах в количествах и в формах, известных из уровня техники.

После получения полотна из восстановленного табака, описанные в данном документе, могут быть нарезаны аналогично цельнолистовому табаку с получением табачного наполнителя, пригодного для сигарет и других табачных продуктов. Полотна восстановленного табака, описанные в данном документе, можно дополнительно подвергать обрезке или обдирке с помощью механических пальцеобразных элементов с получением отсортированных по размеру кусочков, аналогичных ломанным листовым пластинкам природного табака, или нарезать на кусочки ромбовидной формы со стороной от приблизительно 50 до 100 мм. Кусочки полотна из восстановленного табака, описанные в данном документе, могут быть дополнительно смешаны с другими разновидностями табака, такими как табак дымовой сушки, табак Burley, табак Maryland, восточный табак, редкий табак, специальный табак, взорванный табак и т.п. Точное количество каждого типа табака в табачной смеси, применяемой для изготовления конкретной марки сигарет, различается между марками. См., например, Tobacco Encyclopaedia, Voges (Ed.) p. 44-45 (1984), Browne, The Design of Cigarettes, 3rd Ed., p. 43 (1990) и Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis et al. (Eds.) p. 346 (1999). Вся смесь затем может быть скрошена с получением резаного наполнителя и включена в состав табачного продукта.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается способ смешивания табака, в котором по меньшей мере два различных типа табака смешивают с получением табачной мешки. Различные табачные мешки имеют разные рецептуры смешивания разных типов табака. В качестве примера, типы табака могут представлять собой, например, Burley, табак дымовой сушки, восточный, светлый и восстановленный табак. Burley, табак дымовой сушки и восточный табак представляют собой конкретные типы табака, в то время как светлый табак представляет собой предварительно приготовленную смесь табака дымовой сушки и восточного табака. Согласно данному способу предусматривается первый (из типов) сущеного растительного материала табака, и количество лигнина в нем снижено. Для снижения количества лигнина можно применять любой из описанных в данном документе способов. Можно измерять содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в первом сущеном растительном материале табака, и для последующего применения можно выбирать сущеный растительный материал табака, в котором содержание общего и/или связанного с матриксом NNK снижено по сравнению с первым изначально полученным сущеным растительным материалом табака. Далее получают второй сущеный растительный материал табака, имеющий более высокое содержание общего и/или связанного с матриксом NNK, чем содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в первом сущеном растительном материале табака. В некоторых вариантах осуществления содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в этом материале может быть уже известным, следовательно, не будет требоваться измерение этих значений. В других вариантах осуществления содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в этом материале может быть неизвестным, и, следовательно, будет требоваться измерение

этих значений. Таким образом, в этом способе измерение содержания общего и/или связанного с матриксом NNK во втором сущеном растительном материале является необязательной стадией. Первый и второй сущеные растительные материалы табака, полученные на этих стадиях, можно смешивать с применением способов, хорошо

- 5 известных из уровня техники. Необязательно, можно измерять содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в конечном смешанном растительном материале табака. Согласно этому способу можно получать смешанный растительный материал табака, в котором содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в конечном смешанном растительном материале табака ниже, чем во втором сущеном растительном
- 10 материале табака. Этот способ преимущественно можно применять для получения смеси табачного материала, в котором общее содержание NNK в смеси снижено. Табачный материал, в котором количество лигнина было снижено, в основном применяют для разбавления или снижения общего содержания NNK в смешанном табачном материале.

- 15 Табачный материал, полученный или получаемый в соответствии с настоящим раскрытием, также можно применять в резаном табачном наполнителе и в курительном изделии, образованном табачным стержнем из резаного наполнителя. Традиционно табачные продукты с резанным наполнителем для курительных изделий получают преимущественно из пластинчатой части табачного листа, которую отделяют от
- 20 стеблевой части листа в ходе способа трепания. Значительное количество стеблевых частей, которые остаются после удаления и отделения листовой пластиинки, не используется. Для увеличения количества табачного материала, который можно использовать коммерчески, некоторые табачные стебли можно добавлять обратно в резанный наполнитель вместе с листовыми пластинками. Чтобы улучшить вкус и
- 25 характеристики горения табачного стебля для применения в резаном наполнителе, стебли зачастую сначала подвергают одной или нескольким процедурам обработки, которые могут включать процедуры, описанные в данном документе. Стадию вальцевания можно выполнять по отношению к табачным стеблям, которые были подвергнуты способу по настоящему раскрытию. Стебли можно вальцевать до
- 30 получения желаемой толщины, как, например, средней толщины от приблизительно 0,6 мм до 0,8 мм. В ходе последующих стадий переработки и хранения стебли могут расширяться до конечной толщины от приблизительно 0,8 мм до приблизительно 1,0 мм. После вальцевания стебли высушивают и перемещают на табачную фабрику, где их нарезают и добавляют к резаному табачному наполнителю. В некоторых случаях
- 35 стадия вальцевания может быть альтернативно включена как часть способа получения резаного наполнителя в оперативном режиме. Как правило, содержание влаги в табачных стеблях составляет от приблизительно 28% до приблизительно 34% удаляемых в печи летучих веществ перед вальцеванием для предотвращения повреждения структуры стеблей. При необходимости табачные стебли можно кондиционировать перед
- 40 вальцеванием в целях увеличения содержания влаги до данного уровня. Известные способы кондиционирования табачных стеблей включают приведение стеблей в контакт с водой, паром или смесью воды и пара. В способах, где стадия вальцевания включена в оперативном режиме и применяют сущеные стебли, стадия кондиционирования будет, как правило, длиться дольше и может потребовать стадии вымачивания, на которой
- 45 стебли вымачивают в воде в течение нескольких часов перед вальцеванием. Табачные стебли можно вальцевать с применением одностадийного способа вальцевания для уменьшения толщины стеблей до желаемой средней толщины. После вальцевания стебли можно нарезать до ширины среза от 0,1 мм до 0,2 мм. Резаные вальцованные стебли

затем необязательно расширяют с применением известных техник расширения стеблей, а затем высушивают. В случае, когда стебли предварительно вальцают и высушивают, как правило, будет необходимо кондиционировать стебли перед нарезкой для увеличения содержания влаги в табачных стеблях обратно до значения от 28% до 34% удаляемых

5 в печи летучих веществ. Это увеличивает эластичность табачных стеблей в целях ограничения повреждения или ломки стеблей в ходе нарезки. Наконец, резаные вальцованные стебли объединяют с резаными листовыми пластинками табака и любыми дополнительными табачными материалами в целях образования резаного наполнителя, содержащего по меньшей мере 5% по весу резаных вальцованных табачных стеблей.

10 Таким образом, в дополнительном аспекте предусмотрен способ получения табака для применения в качестве резаного табачного наполнителя, включающий стадии: (a) осуществления описанного(описанных) в данном документе способа(способов) и (b) вальцевания и нарезки табачного материала для применения в качестве резаного табачного наполнителя. Также описан способ обработки табачного материала, такого

15 как табачные стебли, для применения в резаном табачном наполнителе, при этом способ включает стадии: (a) осуществления описанного в данном документе способа; (b) вальцевания табачного материала; (c) нарезки табачного материала и (d) необязательно сушки резаных вальцованных стеблей. Вальцованные табачные стебли могут быть объединены с листовыми пластинками табака, так что стадии выполняют по отношению

20 к объединенным табачным стеблям и листовыми пластинками. Стадия нарезки может включать нарезку вальцованных стеблей до ширины среза от приблизительно 0,3 мм до 1,3 мм. Способ может включать стадии отделения стеблей от табачного листа; нарезки стеблей до средней длины от приблизительно 15 мм до 80 мм и вальцевания стеблей до толщины от 0,1 мм до 0,5 мм. Так же предусмотрен способ получения резаного

25 наполнителя, содержащего вальцованные табачные стебли, при этом способ включает обработку табачных стеблей с применением способа, описанного в данном документе; и смешивание обработанных стеблей по меньшей мере с одним типом листовой пластинки табака, расширенным табаком или восстановленным табаком с получением резаного наполнителя.

30 Резаный табачный наполнитель, полученный или получаемый с помощью этого способа, может содержать по меньшей мере 60% и предпочтительно по меньшей мере 80% по весу листовых пластинок табака со средней шириной среза от 0,8 мм до 1,1 мм, в подходящем случае приблизительно 0,9 мм, и средней толщиной приблизительно 0,2 мм. Резаный табачный наполнитель может содержать до 95% по весу листовых

35 пластинок табака со средней шириной среза от приблизительно 0,8 мм до 1,1 мм, в более подходящем случае приблизительно 0,9 мм, и средней толщиной приблизительно 0,2 мм. Частицы листовых пластинок табака в резаном наполнителе, следовательно, имеют такие же размеры, что и частицы табачного стебля. Сами по себе табачные стебли визуально не отличаются от листовых пластинок табака даже при высоком

40 показателе включения. Кроме того, смесь табачных стеблей и листовых пластинок можно преимущественно транспортировать и эффективно перерабатывать без значительного осаждения стеблей. Предпочтительно, средняя ширина среза резаных вальцованных табачных стеблей находится в пределах приблизительно 0,1 мм, в более подходящем случае в пределах приблизительно 0,05 мм от средней толщины листовой

45 пластинки табака в резаном наполнителе. Резаные наполнители могут быть включены в состав множества курительных изделий. Например, резаный наполнитель можно использовать в табачном стержне сгораемого курительного изделия, такого как сигарета с фильтром, сигарилла или сигара. Альтернативно, резаный наполнитель можно

применять для получения табачного субстрата, образующего аэрозоль, в курительном изделии, действующем по принципу возгонки, или электрически нагреваемой курительной системе. Альтернативно, резаный наполнитель можно применять в качестве продукта-самокрутки или продукта из рассыпного табака, например, для применения в трубке.

Табачный материал может быть включен в состав различных продуктов потребления, таких как табачные продукты. Также охвачены способы изготовления таких табачных продуктов. Табачные продукты включают без ограничения курительные изделия или изделия для курения и бездымные табачные продукты, в том числе негорючие продукты, нагреваемые продукты и продукты, образующие аэрозоль. Неограничивающие примеры курительных изделий или изделий для курения включают сигареты, сигариллы, сигары и разновидности трубочного табака. Неограничивающие примеры бездымных табачных продуктов включают разновидности жевательного табака, нюхательного табака и субстраты для применения в продуктах, образующих аэрозоль. Бездымные табачные продукты могут содержать табак в любой форме, включая высушенные частицы, обрезки, гранулы, порошки или пульпу, нанесенный на другие ингредиенты, смешанный с ними, окруженный ими или иным образом объединенный с ними в любом формате, таком как хлопья, пленки, таблетки, пеномагерииалы или шарики. Жидкое содержимое бездымных табачных продуктов может содержаться в устройстве или может быть заключено в форму, такую как шарики, для предотвращения взаимодействия с водорастворимой оберткой. Обертка может иметь форму кисета для частичного или полного закрытия табакосодержащих композиций или для выполнения функции клея для удержания вместе нескольких таблеток, шариков или хлопьев табака.

Иллюстративные материалы для создания обертки включают пленочные композиции, содержащие HPMC, CMC, пектин, альгинаты, пуллулан и другие коммерчески реализуемые пищевые пленкообразующие полимеры. Другие оберточные материалы и могут включать предварительно сформированные капсулы, получаемые из желатина, HPMC, крахмала/каррагинана или других коммерчески доступных материалов. Такие оберточные материалы могут включать табак в качестве ингредиента. Обертки, которые не разрушаются в ротовой полости, могут состоять из тканого или нетканого материала, мелованной или немелованной бумаги или перфорированных или других пористых пластмассовых пленок. Обертки могут содержать в своем составе ароматизирующие или красящие средства. Бездымные продукты могут быть скомпонованы вместе с помощью обертки с применением любого способа, известного специалистам в области серийной упаковки, включая такие способы, как упаковка в блистеры, при которой небольшая упаковка может быть получена с помощью вертикальной упаковочной машины непрерывного действия.

Количество связанного с матриксом NNK в этих изделиях для курения, бездымных продуктах и аэрозолях и т.п. может быть по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100% ниже, как, например, приблизительно на 200% или 300% ниже, по сравнению с продуктами потребления, полученными из контрольного растительного материала табака. Количество свободного NNK может быть практически неизмененным.

Количество связанного с матриксом NNK в этих изделиях для курения, бездымных продуктах и аэрозолях и т.п. может составлять приблизительно 3500 нг/г или менее, или приблизительно 3000 нг/г или менее, или приблизительно 2500 нг/г или менее, или приблизительно 2000 нг/г или менее, или приблизительно 1500 нг/г или менее, или

приблизительно 1000 нг/г или менее, или приблизительно 500 нг/г или менее.

Количество свободного NNK в этих изделиях для курения и бездымных продуктах и т.п. может составлять приблизительно 330 нг/г или менее, приблизительно 300 нг/г или менее, приблизительно 250 нг/г или менее, приблизительно 200 нг/г или менее,

- 5 приблизительно 150 нг/г или менее, приблизительно 100 нг/г или менее или приблизительно 50 нг/г или менее.

Количество NNN в этих изделиях для курения, бездымных продуктах и аэрозолях и т.п. может составлять приблизительно 1700 нг/г или менее, приблизительно 1500 нг/г или менее, приблизительно 1300 нг/г или менее, приблизительно 1100 нг/г или менее,

- 10 приблизительно 1000 нг/г или менее или приблизительно 500 нг/г или менее.

Количество никотина в этих изделиях для курения и бездымных продуктах и т.п. может составлять приблизительно 2600 мкг или менее, приблизительно 2300 мкг или менее, или приблизительно 2100 мкг или менее, или приблизительно 2000 мкг или менее, 1900 мкг или менее или приблизительно 1800 мкг или менее.

- 15 Количество лигнина в этих изделиях для курения и бездымных продуктах и т.п. может соответствовать содержанию приблизительно 6,5% или менее от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани, содержанию приблизительно 6% от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани, содержанию приблизительно 5% от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани, содержанию
- 20 приблизительно 4% от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани или содержанию приблизительно 3% от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани.

В одном варианте осуществления количества связанного с матриксом NNK в этих изделиях для курения и бездымных продуктах и т.п. составляет приблизительно 3500 нг/г или менее, количество свободного NNK составляет приблизительно 300 нг/г или менее, количество NNN составляет приблизительно 1700 нг/г или менее, количество лигнина соответствует содержанию приблизительно 6,4% или менее от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани, и количество никотина составляет приблизительно 2600 мкг или менее.

- 25
- 30 В одном варианте осуществления изделия для курения или бездымные продукты и т.п. содержат приблизительно 3500 нг/г или менее связанного с матриксом NNK. В подходящем случае количество свободного NNK составляет приблизительно 300 нг/г или менее. В подходящем случае количество NNN составляет приблизительно 1700 нг/г или менее. В подходящем случае количество лигнина соответствует содержанию
- 35 приблизительно 6,4% или менее от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани. В подходящем случае количество никотина составляет приблизительно 2600 мкг или менее. В подходящем случае средний размер частиц составляет приблизительно 0,5 мм или более.

- 40
- 45 В другом варианте осуществления изделия для курения или бездымные продукты и т.п. содержат приблизительно 1900 нг/г или менее связанного с матриксом NNK. В подходящем случае количество свободного NNK составляет приблизительно 250 нг/г или менее. В подходящем случае количество NNN составляет приблизительно 1270 нг/г или менее. В подходящем случае количество лигнина в этой сушеной растительной ткани соответствует содержанию приблизительно 4,4% или менее от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани. В подходящем случае количество никотина составляет приблизительно 2300 мкг или менее. В подходящем случае средний размер частиц составляет от приблизительно 0,85 мм до приблизительно 1 мм.

В другом варианте осуществления изделия для курения или бездымные продукты и

т.п. содержат приблизительно 1600 нг/г или менее связанного с матриксом NNK. В подходящем случае количество свободного NNK составляет приблизительно 200 нг/г или менее. В подходящем случае количество NNN составляет приблизительно 1100 нг/г или менее. В подходящем случае количество лигнина в этой сушеной растительной 5 ткани соответствует содержанию приблизительно 3% или менее от общего веса сухого вещества сушеной растительной ткани. В подходящем случае количество никотина составляет приблизительно 2100 мкг или менее. В подходящем случае средний размер частиц составляет более чем приблизительно 1 мм.

Табачный материал можно получать из растений табака, которые включают растения 10 рода *Nicotiana*, различные виды *Nicotiana*, в том числе *N. rustica* и *N. tabacum*. Табачный материал может быть полученным из различных разновидностей видов *Nicotiana*, широко известных как разновидности дымовой сушки или светлые разновидности, разновидности Burley, темные разновидности и восточные/турецкие разновидности. В некоторых вариантах осуществления табачный материал получен из растения, дающего 15 табак Burley, Virginia, табак дымовой сушки, воздушной сушки, огневой сушки, восточный или темный табак. В некоторых вариантах осуществления табачный материал получен, например, из одной или нескольких следующих разновидностей: *N. tabacum* AA 37-1, *N. tabacum* B 13P, *N. tabacum* Xanthi (Mitchell-Mor), *N. tabacum* KT D#3, гибрид 107, *N. tabacum* Bel-W3, *N. tabacum* 79-615, *N. tabacum* Samsun Holmes NN, F4 от скрещивания *N. tabacum* BU21 x *N. tabacum* Hoja Parado, линия 97, *N. tabacum* KTRDC#2, гибрид 49, *N. tabacum* KTRDC#4, гибрид 110, *N. tabacum* Burley 21, *N. tabacum* PM016, *N. tabacum* KTRDC#5 KY 160 SI, *N. tabacum* KTRDC#7 FCA, *N. tabacum* KTRDC#6 TN 86 SI, *N. tabacum* PM021, *N. tabacum* K 149, *N. tabacum* K 326, *N. tabacum* K 346, *N. tabacum* K 25 358, *N. tabacum* K 394, *N. tabacum* K 399, *N. tabacum* K 730, *N. tabacum* KY 10, *N. tabacum* KY 14, *N. tabacum* KY 160, *N. tabacum* KY 17, *N. tabacum* KY 8959, *N. tabacum* KY 9, *N. tabacum* KY 907, *N. tabacum* MD 609, *N. tabacum* McNair 373, *N. tabacum* NC 2000, *N. tabacum* PG 01, *N. tabacum* PG 04, *N. tabacum* P01, *N. tabacum* P02, *N. tabacum* P03, *N. tabacum* RG 11, *N. tabacum* RG 17, *N. tabacum* RG 8, *N. tabacum* Speight G-28, *N. tabacum* TN 86, *N. tabacum* TN 90, *N. tabacum* VA 509, *N. tabacum* AS44, *N. tabacum* Banket A1, *N. tabacum* Basma Drama B84/31, *N. tabacum* Basma I Ziehna XP4/B, *N. tabacum* Basma Xanthi BX 2A, *N. tabacum* Batek, *N. tabacum* Besuki Jember, *N. tabacum* C104, *N. tabacum* Coker 319, *N. tabacum* Coker 347, *N. tabacum* Criollo Misionero, *N. tabacum* PM092, *N. tabacum* Delcrest, *N. tabacum* Djebel 81, *N. tabacum* DVH 405, *N. tabacum* Galpao Comum, *N. tabacum* HB04P, *N. tabacum* Hicks Broadleaf, *N. tabacum* Kabakulak Elassona, *N. tabacum* PM102, *N. tabacum* Kutsage E1, *N. tabacum* KY 14xL8, *N. tabacum* KY 171, *N. tabacum* LA BU 21, *N. tabacum* McNair 944, *N. tabacum* NC 2326, *N. tabacum* NC 71, *N. tabacum* NC 297, *N. tabacum* NC 3, *N. tabacum* PVH 03, *N. tabacum* PVH 09, *N. tabacum* PVH 19, *N. tabacum* PVH 2110, *N. tabacum* Red Russian, *N. tabacum* Samsun, *N. tabacum* Saplak, *N. tabacum* Simmaba, *N. tabacum* Talgar 28, *N. tabacum* PM132, *N. tabacum* Wislica, *N. tabacum* Yayaldag, *N. tabacum* NC 4, *N. tabacum* TR Madole, *N. tabacum* Prilep HC-72, *N. tabacum* Prilep P23, *N. tabacum* Prilep PB 156/1, *N. tabacum* Prilep P12-2/1, *N. tabacum* Yaka JK-48, *N. tabacum* Yaka JB 125/3, *N. tabacum* TI-1068, *N. tabacum* KDH-960, *N. tabacum* TI-1070, *N. tabacum* TW136, *N. tabacum* PM204, *N. tabacum* PM205, *N. tabacum* Basma, *N. tabacum* TKF 4028, *N. tabacum* L8, *N. tabacum* TKF 2002, *N. tabacum* TN90, *N. tabacum* GR141, *N. tabacum* Basma Xanthi, *N. tabacum* GR149, *N. tabacum* GR153 и *N. tabacum* Petit Havana. Раскрыто применение любого из видов рода Nicotiana, включая *N. ruslica* и *N. tabacum* (например, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1 и Petico). Другие виды включают *N. acaulis*, *N. acuminate*, *N. Acuminate* var. *multiflora*, *N. alata*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. benavidesii*, *N.*

benthamiana, N. bigelovii, N. bonariensis, N. cavigola, N. clevelandii, N. cordifolia, N. corymbosa, N. debneyi, N. excelsior, N. forgetiana, N. fragrans, N. glauca, N. glutinosa, N. goodspeedii, N. gossei, N. hybrid, N. ingulba, N. kawakamii, N. knightiana, N. langsdorffii, N. linearis, N. longiflora, N. megalosiphon, N. miersii, N. noctiflora, N. nudicaulis, N. obtusifolia, N. occidentalis, N. occidentalis подв., hesperis, N. otophora, N. paniculata, N. puuciflora, N. petunioides, N. plumbaginifolia, N. quadrivalvis, N. raimondii, N. repanda, N. rosulata, N. rosulata подв., ingulba, N. rotundifolia, N. setchellii, N. simulans, N. solanifolia, N. spegazzinii, N. stocktonii, N. suaveolens, N. sylvestris, N. thyrsiflora, N. tomentosa, N. tomentosiformis, N. trigonophylla, N. umbratica, N. velutina, N. wigandioides и N. x sanderae.

Использование культурных сортов табака и элитных культурных сортов табака также предполагается в данном документе. Особенno пригодные разновидности Nicotiana tabacum включают табак типа Burley, темного типа, типа дымовой сушки и восточного типа. Неограничивающими примерами разновидностей или сортов являются: BD 64, CC 101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 Gold, Coker 48, CD 263, DF911, DT 538 LC, табак Galpao, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P, HB 04P LC, HB3307PLC, гибрид 403LC, гибрид 404LC, гибрид 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K394, K 399, K 730, KDH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY24, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, KTY14xL8 LC, Little Crittenden, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Narrow Leaf Madole, Narrow Leaf Madole LC, NBH 98, N-126, N-777LC, N-7371LC, NC 100, NC 102, NC 2000, NC 291, NC 297, NC 299, NC 3, NC 4, NC 5, NC 6, NC7, NC 606, NC 71, NC 72, NC 810, NC BH 129, NC 2002, Neal Smith Madole, OXFORD 207, PD 7302 LC, PD 7309 LC, PD 7312 LC, табак 'Periq'e', PVH03, PVH09, PVH 19, PVH50, PVH51, R 610, R 630, R 7-11, R 7-12, RG 17, RG 81, RG H51, RGH 4, RGH 51, RS 1410, Speight 168, Speight 172, Speight 179, Speight 210, Speight 220, Speight 225, Speight 227, Speight 234, Speight G-28, Speight G-70, Speight H-6, Speight H20, Speight NF3, TI 1406, TI 1269, TN 86, TN86LC, TN 90, TN 97, TN97LC, TN D94, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, B 13P, Xanthi (Mitchell-Mor), Bel-W3, 79-615, Samsun Holmes NN, KTRDC номер 2, гибрид 49, Burley 21, KY 8959, KY 9, MD 609, PG 01, PG 04, PO1, PO2, PO3, RG 11, RG 8, VA 509, AS44, Basket A1, Basma Drama B84/31, Basma I Zichna ZP4/B, Basma Xanthi BX 2A, Batek, Besuki Jember, C104, Coker 347, Criollo Misionero, Delcrest, Djebel 81, DVH 405, Galpro Comum, HB04P, Hicks Broadleaf, Kabakulak Elassona, Kutsage E1, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, Red Russian, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wislica, Yayaldag, Prilep HC-72, Prilep P23, Prilep PB 156/1, Prilep P12-2/1, Yaka JK-48, Yaka JB 125/3, TI-1068, KDH-960, TI-1070, TW136, Basma, TKF 4028, L8, TKF 2002, GR141, Basma Xanthi, GR149, GR153, Petit Havana. Также предполагаются подразновидности вышеуказанного с низким уровнем превращения никотина в норникотин, даже если они специально не указаны в данном документе.

Следующие примеры предусмотрены в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения. Если не указано иное, в настоящем изобретении применяют традиционные методики и способы молекулярной биологии и биологии растений.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Способ анализа свободного и связанного с матриксом NNK в табаке
Аликовты образцов табака (например, приблизительно 750 мг) экстрагируют приблизительно 30 мл буфера Tris-HCl (50 мм; pH 7,4) путем встряхивания в течение приблизительно одного часа при примерно комнатной температуре. Добавляют внутренние стандарты (100 нг/мл NNK-d₄). Образцы (0,4 мл) экстрактов фильтруют с

применением фильтра на 0,2 мкм, и содержание NNK анализируют с помощью сверхэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (UPLC-MS/MS). Концентрации в образцах, рассчитанные из концентраций в этих экстрактах, соответствуют концентрациям «свободного NNK» в образце. После обработки экстракционных смесей (например, путем нагревания до приблизительно 130°C в течение приблизительно 4 часов) и фильтрования аликовт экстрактов концентрации NNK снова измеряют с помощью UPLC-MS/MS. На основании этих значений можно рассчитать концентрацию «общего NNK» в образцах. Концентрация «связанного с матриксом NNK» представляет собой разность между концентрациями «общего NNK» и «свободного NNK».

Альтернативный способ экстракции «общего NNK» включает подкисление экстракционных смесей концентрированной HCl (например, 3 мл 37% HCl, добавляемой к 30 мл) и инкубирование в течение 48 часов при 80°C. Кислые экстракты нейтрализуют перед фильтрацией и анализом по методу UPLC путем добавления раствора NaOH (6 н., 40 мкл) и суспензии гидроксида магния (10%; 40 мкл) к 320 мкл экстракта.

Пример 2

Анализ по методу UPLC

Применяют колонку Waters Acquity BEH C18, 1,7 мкМ, 2,1 Ч 50 мм. Применяют следующие элюенты: (A) бикарбонат аммония (10 mM; доведен амиаком до pH 9,8) + 2% (объем/объем) ацетонитрила; (B) ацетонитрил. Применяют следующий градиент: 0 мин. - 5% B; 0,5 мин. - 5% B; 3,3 мин. - 18,3% B. Применяемая скорость потока составляет 0,5 мл/мин. Применяемая температура колонки составляет 50°C.

Пример 3

Методика MS/MS

Данный анализ выполняют на спектрометре Waters TQ с применением следующих MRM-переходов: NNK: 208,2→122,2; время выдержки 100 мс; NNK-d4: 212,2→126,2; время выдержки 100 мс; капиллярное напряжение: 0,6 кВ; напряжение на конусе: 25 В; энергия столкновений: 11 эВ; температура источника: 120°C; температура на линии десольватации: 400°C; поток газа десольватации: 800 л/ч.

Пример 4

Распределение связанного с матриксом NNK в лигнифицированных и нелигнифицированных тканях стеблей табака Burley

Приблизительно 2 грамма средних жилок сушеных листьев табака Burley вручную разделяют на внутреннюю лигнифицированную ткань (36% общего веса сухого вещества) и наружную нелигнифицированную ткань (64% общего веса сухого вещества). В каждом из этих образцов концентрацию свободного NNK и общего NNK анализируют с помощью описанной выше UPLC-MS. Концентрацию связанного с матриксом NNK рассчитывают как разность между концентрациями свободного NNK и общего NNK. Количественное определение содержания лигнина выполняют с применением фотометрического способа, основанного на дериватизации с помощью тиогликолевой кислоты (см. Brinkmann et al. (2002) J. Chem. Ecol., 28, 2483-2501).

Результаты на фигуре 1 демонстрируют распределение свободного NNK, связанного с матриксом NNK и лигнина в лигнифицированных (L) и нелигнифицированных (NL) тканях сушеных стеблей табака Burley. Фигура 2 представляет собой поперечный разрез гидратированного сущеного стебля табака Burley, на котором показана лигнифицированная (L) и нелигнифицированная (NL) ткань. Лигнифицированная ткань окрашена красным с помощью флуороглюцина. Результаты на фигуре 3 демонстрируют содержание связанного с матриксом NNK в лигнифицированных и нелигнифицированных

тканях зеленых средних жилок после нитрозирования раствором нитрита натрия.

Эти результаты демонстрируют, что связанный с матриксом NNK распределен главным образом в лигнифицированных тканях стеблей и средних жилок табака Burley.

Пример 5

Обогащение фракции стеблей табака Burley с низким содержанием связанного NNK с помощью сублимационной сушки, измельчения и разделения по размеру

Образец стеблей табака Burley (52 г) увлажняют водой (350 мл) и высушивают сублимацией. Часть полученного материала (12 г) измельчают путем встряхивания со стальными шариками (2 шарика, диаметр 2 см; 300 об./мин.; 15 мин.) и с помощью 10 встряхивателя для сит разделяют на фракции с разным размером частиц в диапазоне от значения, превышающего 1 мм, до значения менее 0,25 мм.

На фигуре 4 и в таблице 1 приведены уровни свободного и связанного с матриксом NNK, NNN, лигнина и никотина во фракциях после просеивания высущенных 15 сублимацией измельченных стеблей табака Burley. Результаты анализа свободного и связанного с матриксом NNK, приведенные на фигуре 5 и в таблице 1, указывают на то, что как содержание лигнина (в виде % сухого веса каждой фракции), так и содержание связанного с матриксом NNK уменьшается во фракциях с размером частиц более 0,5 мм, в том числе во фракциях с размером частиц от 0,5 мм до 0,85 мм, от 0,85 мм до 1 мм и более 1 мм. На фигуре 5 показано, что содержание лигнина хорошо коррелирует 20 с содержанием связанного с матриксом NNK, что, таким образом, является подтверждением колокализации лигнина и связанного с матриксом NNK.

Пример 6

Локализация предшественника связанного с матрицей NNK в зеленых средних жилках табака TN90 и стеблях табака Burley

25 Относительное распределение связанного с матриксом NNK измеряют в склеренхимной и отличной от склеренхимной ткани средних жилок табака TN90. Предположение того факта, что связанный с матриксом NNK связан с лигнином, позволяет предположить более высокую концентрацию его предшественника в лигнифицированной склеренхимной ткани. Во втором эксперименте исследуют 30 относительное распределение свободного и связанного с матриксом NNK в склеренхимной и отличной от склеренхимной ткани стеблей (сущеного) табака Burley.

Материалы и способы

Зеленые средние жилки

Средние жилки (только проксимальные половинки) 15 зрелых листьев TN90 вручную 35 разделяют на склеренхимную ткань (S) («центр» средней жилки) и ткань, отличную от склеренхимной (NS). Обе ткани высушивают сублимацией и подвергают тонкому измельчению. Нерастворимую в воде фракцию двух материалов определяют путем трехкратного экстрагирования 1 г каждого из них с помощью 40 мл метанола/воды 1:3 (при комнатной температуре в течение 1 часа) и взвешивания нерастворимого 40 материала (обозначенного как SW и NSW) после сублимационной сушки. Измерения в анализе псевдооксиникотина (PON) и никотина в S и NS (n=5) проводят с применением следующих способов. Тонкоизмельченный растительный материал (~20 мг) экстрагируют путем встряхивания при комнатной температуре в течение 45 минут смесью метанол/вода (4:1), содержащей PON-метил-d₃ в качестве внутреннего стандарта 45 (200 нг/мл). После фильтрации (0,2 мкм) образцы подвергают анализу по методу LC-MS с применением следующих условий: колонка: колонка Acuity UPLC BEH C18 (1,7 мкм, 50 Ч 2,1 мм; Waters); температура колонки: 50 С; элюенты: Водный бикарбонат аммония, доведенный до pH 9,8 с применением NH₃ с ацетонитрилом (98:2, объем/объем;

элюент А); ацетонитрил (элюент В); градиент: 0 мин. - 0% В, 0,5 мл/мин.; 0,5 мин. - 0% В, 0,5 мл/мин.; 6 мин. - 30% В, 0,5 мл/мин.; MS-детектирование: PON - от масса/заряд 179,2 до масса/заряд 106,1; PON-метил-d₃ - от масса/заряд 182,2 до масса/заряд 106,1;

UV-детектирование: 260 нм. PON и никотин элюируют через 2,6 и 4,1 минуты

⁵ соответственно. Для количественного определения никотина применяют площадь пика при 260 нм и внешнюю калибровку. Чтобы оценить содержание предшественника связанного с матриксом NNK в S, NS, SW и NSW, аликовты (~20 мг; n=5) этих материалов подвергают нитрозированию путем инкубирования в растворе NaNO₂ (1,5 мл (10 мг/мл в воде)) в течение 4 часов при комнатной температуре со встряхиванием, ¹⁰ центрифугируют и промывают/центрифугируют четыре раза с 10 мл воды. Затем осадок после центрифугирования каждого нитрозированного образца поглощают в 4 мл буфера Tris-HCl (50 мМ, pH 7,5; с NNK-d4 и NNN-d4 при 100 нг/мл), автоклавируют (в течение 4 часов при 130°C) и анализируют в отношении содержания NNK с применением описанных в данном документе способов.

¹⁵ Сушеные стебли табака Burley

Образец стебля табака Burley (2 г = четыре кусочка на ~5 см) вручную разделяют на наружную (нелигнифицированную) ткань (CNS) и внутреннюю (лигнифицированную) часть (CS). Оба образца подвергают тонкому измельчению в вибрационной мельнице («TissueLyzer» от Retsch в течение 2,5 минут, 50 с-1). В результате получают ²⁰ соответственно 1183 мг и 651 мг порошка CNS и CS. Количество свободного NNK в двух образцах определяют после экстракции ~50 мг аликовт (n=5) 1,5 мл буфером Tris (+IS) в течение 1 часа при комнатной температуре. Содержание общего NNK определяют после автоклавной экстракции (130°C в течение 4 часов) ~50 мг аликовт (n=5) в 5 мл буфера Tris (+IS).

²⁵ Результаты

Результаты этого эксперимента приведены в таблице 2 и на фигуре 6. После нитрозирования и промывания в склеренхимной ткани (S) обнаруживают в 7 раз более высокую концентрацию связанного с матриксом NNK по сравнению с наружными слоями средних жилок (NS). Концентрация как PON, так и никотина в два раза выше в NS, чем в S. Результаты экспериментов с этим искусственным нитрозированием подтверждаются уровнями связанного NNK в лигнифицированных (CS) и ³⁰ нелигнифицированных (CNS) частях образца сущеного стебля коммерческого табака Burley. Хотя концентрация свободного NNK в два раза выше в CS, концентрация связанного с матриксом NNK в 7 раз выше в CS. Уровни никотина и NNN выше в CS, чем в CNS, и ниже, чем NNK.

Выходы

Наличие предшественника связанного с матриксом NNK в высоких концентрациях в лигнифицированной склеренхимной ткани зеленых средних жилок указывает на то, что связанный с матриксом NNK ковалентно или нековалентно связан с лигнином.

⁴⁰ Любая публикация, процитированная или описанная в данном документе, предоставляет соответствующую информацию, раскрытою до даты подачи настоящей заявки. Заявления, сделанные в данном документе, не должны быть истолкованы как допущение того, что авторы настоящего изобретения не имеют право датировать более ранним числом такие раскрытия. Все публикации, упомянутые в вышеприведенном ⁴⁵ описании, включены в данный документ с помощью ссылки. Различные модификации и варианты настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области без отступления от объема и сущности настоящего изобретения. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными

вариантами осуществления, следует понимать, что настоящее изобретение, как заявлено, не должно быть неправомерно ограничено такими конкретными вариантами осуществления. В действительности различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в клеточной, молекулярной 5 биологии и биологии растений или в смежных областях, предназначены находиться в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ТАБЛИЦА 1

	Фракция после просеивания	Доля от общего веса [%]	Свободный NNK [нг/г]	NNN [нг/г]	NIC [мкг/г]	Связанный NNK [нг/г]	Лигнин [% сухого веса]
10	A: > 1 мм	16	200	1098	2091	1606	2,92
	A: 0,85-1 мм	4	251	1269	2307	1905	4,41
	A: 0,5-0,85 мм	16	328	1690	2608	3500	6,33
20	A: 0,25-0,5 мм	27	463	2305	2937	6218	11,31
	A: <0,25 мм	38	297	1732	3237	2936	4,81
	Общее содержание		329	1760	2839	3651	6,47

25

30

35

40

45

ТАБЛИЦА 2

	Сыро й вес	Сухо й вес	Сухое веществ о [%]	До промыван ия [мг]	После промыван ия [мг]	Нерастворим ые в воде вещества [% сухого веса]	Нерастворим ые в воде вещества [% сырого веса]
5	[г]	[г]	о [%]	ия [мг]	ия [мг]		
	S	25	3.1	1010	668	66	8,2
10	NS	171	11	6.4	1010	414	41
	CS		0,65				
	CN		1,18				
	S						
15	Образец	PON [мкг/г]	NIC [мкг/г]	PON/NIC *1000	NNK после автоклавирования [нг/г]	NNN [нг/г]	Свободный NNK [нг/г]
20	S		265		13245	1660	
	NS		116		184	111	
	SW		331		17610	1595	
	NSW		109		326	272	
25	PON-S	6,8	784	8,63			
	PON-NS	14,0	1909	7,32			
	Свободный в CS		9496			1356	120
30	Свободный в CNS		7985			895	64
	Общий в CS		8459		2038		
35	Общий в CNS		7057		310		

(57) Формула изобретения

1. Способ снижения количества связанного с матриксом NNK в сушеном растительном материале табака, включающий отделение лигнифицированной ткани от нелигнифицированной ткани, где количество лигнина снижают механическим путем, где лигнифицированную ткань отделяют от нелигнифицированной ткани путем удаления сосудистого пучка, ксилемы или лигнифицированной склеренхимной ткани.
2. Способ по п. 1, включающий стадии:
- (а) получения сушеного растительного материала табака;
 - (б) отделения лигнифицированной ткани от нелигнифицированной в сушеном растительном материале табака и
 - (с) получения сушеного растительного материала табака, в котором снижено

количество лигнина и снижено количество связанного с матриксом NNK по сравнению с сушеным растительным материалом табака, получаемым на стадии (а).

3. Способ по п. 2, где за стадией (а) следует дополнительная стадия измерения количества по меньшей мере связанного с матриксом NNK, и где за стадией (b)

5 необязательно следует дополнительная стадия измерения количества по меньшей мере связанного с матриксом NNK.

4. Способ по п. 3, где указанный способ включает дополнительную стадию (d) сравнения уровня по меньшей мере связанного с матриксом NNK, измеряемого после стадии (а), с уровнем связанного с матриксом NNK, измеряемым после стадии (b), где 10 снижение количества связанного с матриксом NNK в табачном материале, получаемом на стадии (b), по сравнению с табачным материалом, получаемым на стадии (а), указывает на то, что количество связанного с матриксом NNK в табачном материале снижено.

5. Способ снижения образования связанного с матриксом NNK в ходе сушки

15 растительного материала табака, включающий снижение в нем количества лигнина до сушки, включающий стадии:

(а) получения несущего растительного материала табака;

(b) механического отделения лигнифицированной ткани от нелигнифицированной в несущем растительном материале табака до сушки;

20 (c) сушки растительного материала табака, получаемого на стадии (b); и

(d) получения сущего растительного материала табака, в котором количество связанного с матриксом NNK снижено по сравнению с контролем, в котором количество лигнина не было снижено, где лигнифицированную ткань отделяют от нелигнифицированной ткани путем удаления сосудистого пучка, ксилемы или

25 лигнифицированной склеренхимной ткани.

6. Способ по п. 5, где за стадией (а) следует дополнительная стадия измерения

количества по меньшей мере связанного с матриксом NNK, и где за стадией (b)

необязательно следует дополнительная стадия измерения количества по меньшей мере связанного с матриксом NNK, и где за стадией (c) необязательно следует дополнительная

30 стадия измерения количества по меньшей мере связанного с матриксом NNK,

предпочтительно

где после стадии (c) или стадии (d) указанный способ включает дополнительную стадию сравнения уровня по меньшей мере связанного с матриксом NNK, измеряемого после стадии (a), с уровнем по меньшей мере связанного с матриксом NNK, измеряемым

35 после стадии (b) и/или стадии (c), где снижение количества связанного с матриксом

NNK в табачном материале, получаемом на стадии (b) или стадии (c), по сравнению с табачным материалом, получаемым на стадии (a), указывает на то, что количество связанного с матриксом NNK в табачном материале снижено.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где растительный материал табака

40 обрабатывают с целью расширения нелигнифицированной растительной ткани, где количество лигнина снижают путем разделения расширенной и нерасширенной

растительной ткани на основании различных показателей их плотности, и/или различных показателей их прочности, и/или различных размеров их частиц, и/или

где растительный материал, получаемый на стадии (a), содержит средние жилки

45 растений, или стебли растений, или черешки растений, или комбинацию двух или более из них, или состоит из них, или состоит главным образом из них.

8. Растительный материал табака, полученный или получаемый с помощью способа по любому из пп. 1-7.

9. Применение растительного материала табака, в котором количество лигнина было снижено по сравнению с контрольным растительным материалом табака путем механического отделения лигнифицированной ткани от нелигнифицированной ткани, для получения табака со сниженными уровнями связанного с матриксом NNK, где
⁵ указанные уровни связанного с матриксом NNK снижены по сравнению с контролем, где лигнифицированную ткань отделяют от нелигнифицированной ткани путем удаления сосудистого пучка, ксилемы или лигнифицированной склеренхимной ткани.

10. Способ получения восстановленного табака, включающий стадии:

(a) осуществления способа по любому из пп. 1-7;

¹⁰ (b) получения восстановленного табака из табачного материала, получаемого на стадии (a); и

(c) необязательно включения восстановленного табака в состав табачного продукта.

11. Восстановленный табак, полученный или получаемый с помощью способа по п. 10.

¹⁵ 12. Способ получения табака для применения в качестве резаного табачного наполнителя, включающий стадии:

(a) осуществления способа по любому из пп. 1-8 и

(b) вальцевания и нарезки табачного материала для применения в качестве резаного табачного наполнителя.

²⁰ 13. Сушеный растительный материал табака, имеющий сниженный уровень лигнина по сравнению с контрольным растительным материалом табака, в котором количество лигнина не было снижено, где количество лигнина в сушеном растительном материале табака было снижено путем механического отделения лигнифицированной ткани от нелигнифицированной ткани, где сосудистый пучок или ксилема, или лигнифицированная
²⁵ склеренхимная ткань практически отсутствует в сушеной растительной ткани, и где количество связанного с матриксом NNK составляет приблизительно 3500 нг/г или менее, предпочтительно

где количество свободного NNK составляет менее чем приблизительно 330 нг/г, где необязательно содержание NNN составляет менее чем приблизительно 1700 нг/г, и где

³⁰ необязательно содержание никотина составляет менее чем приблизительно 2610 мкг/г; и/или

где сушеный растительный материал табака содержит корковый слой растения, как, например, наружный корковый слой растения, состоит из него или состоит главным образом из него.

³⁵ 14. Табачный продукт или продукт из восстановленного табака, содержащий растительный материал табака по п. 8 или сушеный растительный материал по п. 13, состоящий из него или состоящий главным образом из него.

15. Способ смешивания табака, в котором по меньшей мере два различных типа табака смешивают с получением табачной мешки, включающий стадии: (a) получения ⁴⁰ первого сушеного растительного материала табака и снижения в нем количества лигнина путем механического отделения лигнифицированной ткани от нелигнифицированной ткани;

⁴⁵ (b) измерения содержания общего и/или связанного с матриксом NNK в первом сушеном растительном материале табака и отбора сушеного растительного материала табака, в котором содержание общего и/или связанного с матриксом NNK снижено по сравнению с первым сушеным растительным материалом табака, получаемым на стадии (a);

(c) получения второго сушеного растительного материала табака, имеющего более

высокое содержание общего и/или связанного с матриксом NNK, чем содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в первом сущеном растительном материале табака, получаемом на стадии (b), и необязательно измерения содержания общего и/или связанного с матриксом NNK во втором сущеном растительном материале табака;

5 (d) смешивания первого и второго сущеного растительного материала табака из стадий (b) и (c) и необязательно измерения содержания общего и/или связанного с матриксом NNK в смешанном растительном материале табака и

(e) получения смешанного растительного материала табака, в котором содержание общего и/или связанного с матриксом NNK в смешанном растительном материале

10 табака ниже, чем во втором сущеном растительном материале табака, получаемом на стадии (c), где лигнифицированную ткань отделяют от нелигнифицированной ткани путем удаления сосудистого пучка, ксилемы или лигнифицированной склеренхимной ткани,

где необязательно стадии (a) и (b) осуществляют после стадии (c).

15

20

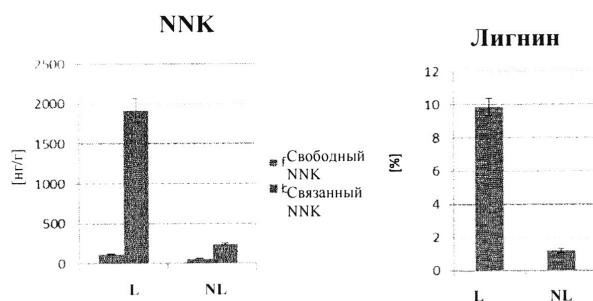
25

30

35

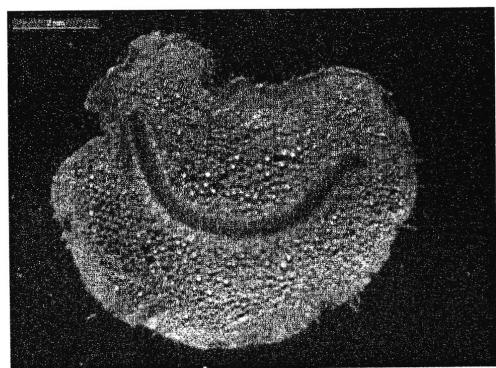
40

45

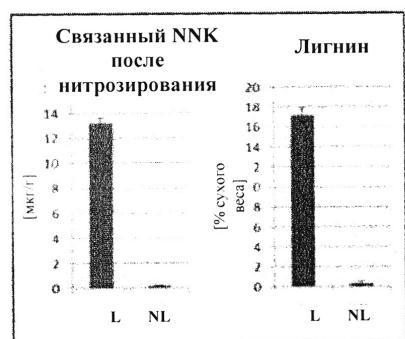


ФИГУРА 1

2/6

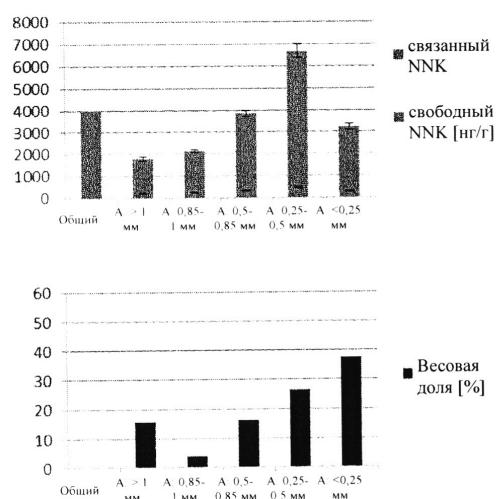


ФИГУРА 2



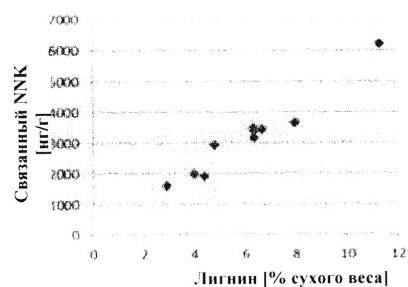
ФИГУРА 3

4/6

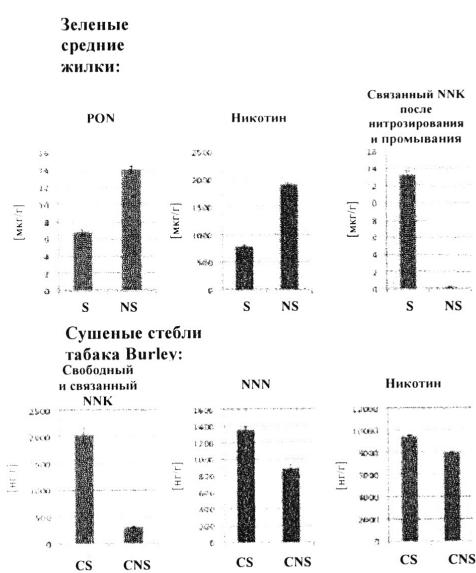


ФИГУРА 4

5/6



ФИГУРА 5



ФИГУРА 6