

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 151**

51 Int. Cl.:

C07H 1/08 (2006.01)

C07H 15/256 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2012 E 12193267 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2594574**

54 Título: **Método para purificar rebaudiósido C**

30 Prioridad:

18.11.2011 US 201161561483 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2014

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL FLAVORS & FRAGRANCES,
INC. (100.0%)
521 West 57th Street
New York, NY 10019, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, ZHEN y
SINGH, AJAY PRATAP**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 524 151 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para purificar rebaudiósido C

5 **Antecedentes de la invención**

La planta perene sudamericana *Stevia rebaudina Bertoni* se conoce por sus edulcorantes naturales. El dulzor de la planta de *Stevia* se atribuye a la presencia de glucósidos de alta intensidad dulce. Los glucósidos derivados de *Stevia* (glucósidos de esteviol) incluyen esteviósido (4-13% de peso seco), rebaudiósido A (2-4%), rebaudiósido C (1-2%), dulcósido A (0,4-0,7%) y trazas de esteviolbiósido, rubosósido y rebaudiósidos B, D, E, y F (Kinghorn (2002) Kinghorn (ed.) *Stevia, the Genus Stevia*. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles, Vol. 19. Taylor y Francis, Londres y NY). Entre estos glucósidos, solo el esteviósido y rebaudiósido A están actualmente comercialmente disponibles en grandes cantidades. Las materias primas para producir esteviósido y rebaudiósido A son hojas estrujadas del arbusto perenne. Los procesos de extracción convencionales para obtener extractos que contienen glucósidos de esteviol que se describen en la bibliografía siguen metodologías similares: las hojas de estevia se extraen con agua caliente o alcoholes, el extracto se clarifica por precipitación con sal o soluciones alcalinas y se concentra, y el extracto se redisuelve en alcoholes cortos (metanol o etanol) para la cristalización de los glucósidos.

También se han desarrollado métodos para extraer rebaudiósido C. El documento WO 2011/037959 describe la purificación de rebaudiósido C sometiendo a reflujo un sólido de extracto crudo de estevia o un sólido de rebaudiósido C crudo en un solvente mezcla (EtOH al 95%/MeOH/H₂O = 12.5/6/2), o (propanol al 95%/MeOH = 12,5/7,5). La solución posteriormente se enfría a 22°C y se siembra con cristales de rebaudiósido C puro al 93-98%. La mezcla resultante se deja a 22°C durante 16 horas y el producto cristalino blanco se filtra, se lava dos veces con una mezcla de EtOH/MeOH (4/1) y se seca para dar producto de rebaudiósido C purificado. La principal desventaja de este proceso es que se necesita rebaudiósido C de alta pureza para inducir la purificación. Además, el rendimiento de este proceso y la pureza del material obtenido no se divulgan.

La patente china No. 102127130 describe un método de purificar rebaudiósido C pasando una solución cruda que contiene aproximadamente el 17% de rebaudiósido C a través de una membrana de ultrafiltración para generar una fracción que tiene un contenido en rebaudiósido C del 26%. La fracción se concentra a 55°C hasta que el contenido sólido alcanza el 40%. Posteriormente, el líquido y el sólido se separan de modo que el sólido contiene aproximadamente el 33% de rebaudiósido C. Este rebaudiósido C crudo se purifica adicionalmente por recristalización de un solvente mezcla (EtOH al 87%/MeOH al 68%/acetona al 87% = 3/2/1) y la pureza resultante del rebaudiósido C es del 85,4%.

Los métodos convencionales para producir y purificar rebaudiósido C requieren numerosos pasos de reacción o pasos de purificación repetitivos. Hay una necesidad para un método sencillo, eficaz y económico para la producción de rebaudiósido C de alta pureza, que se puede usar en la industria alimenticia, de bebida, farmacéuticas, cosmética y otras.

40 **Compendio de la invención**

Esta invención presenta un método para purificar rebaudiósido C. El método de la invención implica los pasos de:

- 45 (a) extraer un material que contiene rebaudiósido C y reducido en rebaudiósido A con una solución de acetato de etilo y 1-butanol;
 (b) retener la fracción soluble en acetato de etilo y 1-butanol;
 (c) poner en contacto la fracción soluble en acetato de etilo y 1-butanol con una solución de acetona y agua para recristalizar el rebaudiósido C; y
 50 (d) recoger el rebaudiósido C cristalizado purificando de esta manera el rebaudiósido C.

En algunas formas de realización, la proporción de acetato de etilo:1-butanol es 60-70:30-40 y la proporción de acetona:agua es 80-90:10-20. En otras formas de realización, el material que contiene rebaudiósido C y reducido en rebaudiósido A es una solución de tetrahidrofurano y agua, en donde la proporción de tetrahidrofurano:agua es 20-30:70-80. En formas de realización adicionales, el método incluye los pasos previos de extraer el material que contiene rebaudiósido C y reducido en rebaudiósido A con una primera solución de acetato de etilo:1-butanol (80-90:10-20) y descartar la fracción soluble en acetato de etilo:1-butanol. En aún formas de realización adicionales, el método incluye el paso adicional de someter el rebaudiósido C recristalizado a una segunda recristalización, en donde la segunda recristalización emplea una solución de 1-butanol:agua (97:3). En aún otra forma de realización, el rebaudiósido C recristalizado se lava con una solución de acetona:agua (85:15).

Descripción detallada de la invención

65 Como se muestra en la tabla 1, el análisis por HPLC del "material de desecho" generado durante el proceso de producción de rebaudiósido A contiene aproximadamente el 17% de rebaudiósido A y el 20% de rebaudiósido C junto con otros glucósidos.

TABLA 1

Tiempo de retención (minutos)	Identidad	Porcentaje del total
15,974	Desconocido	16,13
21,631	Desconocido	1,95
22,194	Desconocido	0,19
24,425	Rebaudiósido A	17,18
24,840	Esteviósido	20,79
25,801	Desconocido	0,27
26,187	Rebaudiósido F	2,88
26,800	Rebaudiósido C	20,98
27,444	Dulcósido A	2,74
27,854	Desconocido	0,27
28,451	Isómero de esteviósido	2,90
30,420	Rubusósido	1,68
32,133	Desconocido	5,90
33,221	Esteviolbósido	6,14

5 Dado el alto porcentaje de rebaudiósido C en el “material de desecho” y la utilidad del rebaudiósido C como un
 10 edulcorante, la presente invención presenta un método de obtener rebaudiósido C de alta pureza empezando de
 este “material de desecho” generado durante el proceso de producción de rebaudiósido A. Según el método
 presente, un material que contiene rebaudiósido C y reducido en rebaudiósido A se extrae con una solución de
 acetato de etilo/1-butanol y la fracción soluble en acetato de etilo/1-butanol se retiene. Posteriormente, el
 rebaudiósido C se recristaliza de la fracción soluble en acetato de etilo/1-butanol con una solución de acetona/agua
 y el rebaudiósido C recristalizado se recoge. Ventajosamente, el método presente se lleva a cabo en ausencia de
 siembra con cristales de rebaudiósido C puro.

15 Como se usa en el contexto del presente método, “un material que contiene rebaudiósido C y reducido en
 rebaudiósido A” es un material de partida, en particular un extracto de *Stevia* o una fracción de un extracto de *Stevia*,
 que tiene todo o una parte del rebaudiósido A eliminado. En una forma de realización, el material de partida del
 método presente ha tenido el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o el 100% de la cantidad original de rebaudiósido A
 eliminado. A modo de ilustración, mientras que las hojas de *Stevia* tienen al menos el doble de la cantidad de
 rebaudiósido A (2-4%) que de rebaudiósido C (1-2%), un material que contiene rebaudiósido C y reducido en
 rebaudiósido A puede contener cantidades iguales de rebaudiósido C y rebaudiósido A, o menos rebaudiósido A que
 rebaudiósido C.

25 En algunas formas de realización, el material de partida del método presente es “un material derivado de *Stevia*” que
 contiene rebaudiósido C y reducido en rebaudiósido A. En otras formas de realización, el material de partida es un
 extracto de *Stevia* o una fracción de un extracto de *Stevia* preparado por métodos convencionales.

30 El material de partida se puede obtener en forma sólida, semisólida o líquida. Cuando está en forma sólida o
 semisólida, es deseable que el material de partida se disuelva en un solvente apropiado para facilitar la extracción
 líquido-líquido. A este respecto, formas de realización particulares abarcan un material de partida que es una
 solución que contiene rebaudiósido C y reducido en rebaudiósido A. Como se demuestra en el presente documento,
 el material de partida sólido se disolvió fácilmente en una solución de tetrahidrofurano (THF) y agua. Según esto, se
 contempla que solventes con polaridad similar al THF, por ejemplo, acetato de *n*-butilo, alcohol isobutílico, metil
 isoamil cetona, o alcohol *n*-propílico, también pueden ser de uso en el método presente como un solvente para
 disolver el material de partida. Sin embargo, en formas de realización particulares, el material de partida se disuelve
 en una solución de tetrahidrofurano (THF) y agua. Según esta forma de realización, la proporción de THF respecto al
 agua está en el intervalo de 20-30 a 70-80 (volumen/volumen (v/v)). En formas de realización particulares, la
 proporción de THF respecto a agua 25 a 75 (v/v).

40 Para enriquecer en rebaudiósido C, el material de partida se somete a una extracción líquido-líquido. Según este
 paso del método presente, el material de partida se extrae una o más veces con una o más soluciones de acetato de
 etilo y 1-butanol. En algunas formas de realización, el material de partida se extrae una o más veces con una
 solución que contiene acetato de etilo/1-butanol, en donde la proporción de acetato de etilo respecto a 1-butanol es
 60-70 a 30-40 (v/v). En particular, esta forma de realización abarca una proporción de acetato de etilo respecto a 1-
 butanol de 75 a 35 (v/v). En otras formas de realización, primero se eliminan compuestos de baja polaridad
 extrayendo el material de partida una o más veces con una solución que contiene acetato de etilo/1-butanol, en
 donde la proporción de acetato de etilo respecto a 1-butanol es 80-90 a 10-20 (v/v). Según esta forma de realización,
 la fracción soluble en acetato de etilo/1-butanol se desecha y el retenido se extrae adicionalmente con una segunda
 solución de acetato de etilo y 1-butanol.

50 Según esto, en una forma de realización, la extracción del material de partida con una solución de acetato de etilo/1-
 butanol incluye los pasos de:

- (i) extraer el material de partida con una solución que contiene acetato de etilo y 1-butanol en una proporción de 60-70 a 30-40; y
- (ii) retener la fracción de acetato de etilo/1-butanol de (i).

5 En una forma de realización alternativa, la extracción del material de partida con una solución de acetato de etilo/1-butanol incluye los pasos de:

- (i) extraer el material de partida con una primera solución que contiene acetato de etilo y 1-butanol en una proporción de 80-90 a 10-20,
- (ii) desechar la fracción de acetato de etilo/1-butanol;
- (iii) extraer el retenido de (ii) con una segunda solución que contiene acetato de etilo y 1-butanol en una proporción de 60-70 a 30-40, y
- (iv) retener la fracción de acetato de etilo/1-butanol de (iv).

15 Mientras que se demostró que el material de partida era extraíble con solución de acetato de etilo/1-butanol, se pueden usar otros solventes adecuados, incluyendo por ejemplo, 2-butanona, alcohol *n*-propílico, acetato de *n*-butilo e isopropanol, usados solos o en combinación entre sí o con acetato de etilo o 1-butanol.

20 Según el siguiente paso del método presente, el material de extracción líquido-líquido o la fracción soluble en acetato de etilo y 1-butanol se pone en contacto con una solución de acetona y agua para recristalizar el rebaudiósido C. En algunas formas de realización, la proporción de acetona respecto a agua es 80-90 a 10-20 (peso/peso (p/p)). En ciertas formas de realización, la proporción de acetona respecto a agua es 85 a 15 (p/p). Además de acetona, se contempla que se puedan usar otros solventes tales como acetonitrilo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, 2-butanol, tert-butanol o mezclas de los mismos para recristalizar el rebaudiósido C. Para facilitar la recristalización, la mezcla se puede calentar a una temperatura elevada de entre 40°C y 60°C, o más preferiblemente entre 45°C y 50°C, y posteriormente enfriar a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, 19-22°C). Tras la formación de cristales, el rebaudiósido C recristalizado se recoge, por ejemplo, por filtración, y se puede secar para su almacenamiento.

30 Como aún otra forma de realización, el rebaudiósido C recristalizado se puede lavar para enriquecer más el rebaudiósido C. Según esta forma de realización, el rebaudiósido C recristalizado se lava con una solución de acetona:agua en una proporción de 85:15. La mezcla se puede calentar a una temperatura elevada de entre 40°C y 60°C, o más preferiblemente entre 45°C y 50°C durante aproximadamente de 1 a 3 horas o más preferiblemente 2 horas, y posteriormente enfriar a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, 19-22°C). La mezcla se filtra posteriormente para recoger el rebaudiósido C sólido. Al incluir este paso, la cantidad de rebaudiósido C se puede enriquecer a más del 90%.

40 Como una forma de realización adicional, el método presente puede incluir el paso adicional de someter el rebaudiósido C recristalizado a una segunda recristalización, en donde la segunda recristalización es una solución de 1-butanol:agua (97:3).

45 El rebaudiósido C purificado según el método presente es 70-100% homogéneo con respecto al rebaudiósido C y encuentra uso como un edulcorante en una variedad de productos alimenticios, suplementos alimenticios, nutracéuticos, composiciones farmacéuticas, composiciones higiénicas dentales, edulcorantes de mesa y productos cosméticos. Además, el presente rebaudiósido C se puede usar en la preparación de productos consumibles tales como productos alimenticios y farmacéuticos, que retienen un dulzor deseado pero contienen cantidades menores de un edulcorante glucídico, tal como azúcar, y en algunos casos menos calorías.

50 La invención se describe en mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Purificación inicial de rebaudiósido C de extractos crudos

55 Usando una variedad de diferentes sistemas de solventes, se observó que una mezcla de acetona y agua era un solvente adecuado para la recristalización de rebaudiósido C a partir de material de partida crudo (es decir, "material de desecho" generado durante el proceso de producción de rebaudiósido A). Según esto, se determinó el rendimiento de recristalización de rebaudiósido C del material de partida. Para estos experimentos, el material de partida crudo se mezcló con acetona/agua (85/15, p/p). Típicamente, para 1 g de sólido, se usaron 4-6 g de solvente. La mezcla se calentó a 48°C y se dejó que todo el sólido se disolviera. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 3-4 días. La solución se filtró para recoger el precipitado blanco, que después se lavó con acetona y se secó al vacío a 50°C durante 8 horas,

TABLA 2

Cantidad de material de partida crudo	Contenido en Reb C en crudo	Cantidad de sólido obtenido	Contenido en Reb C en sólido	Rendimiento de recuperación de Reb C
5 g	24,5%	0,9 g	77,0%	56,6%
5 g	32,5%	1,4 g	69,6%	60,0%
5 g	32,5%	1,3 g	76%	60,8%
20 g	32,5%	5,2 g	75,6%	60,5%
6,0 g	36,4%	1,84 g	76,8%	64,7%
6,84 g	40,7%	2,37 g	74,3%	63,2%
16 g	44,0%	6,34 g	80,0%	72,0%
14 g	44,0%	6,08 g	81,7%	80,6%

Reb C, rebaudiósido C.

5 Este análisis indicaba que el "material de desecho" no era óptimo para la recristalización directa de rebaudiósido C y que material de partida que contuviera un mayor contenido en rebaudiósido C, produciría un sólido con mayor pureza y rendimiento. Según esto, para aumentar la pureza y el rendimiento, el material de partida se sometió a extracción líquido-líquido con diferentes solventes.

10 Se disolvieron veinte gramos de material de partida de rebaudiósido C en 500 ml de acetona, que contenía 70-80 de agua (v/v). La solución se extrajo dos veces con 500 ml de acetato de etilo que contenía el 15% de 1-butanol (v/v). La fase de 1-butanol/acetato de etilo principalmente contenía compuestos menos polares y por tanto se descartó. Posteriormente, la fase de acetona/agua se extrajo adicionalmente dos veces con 500 ml de acetato de etilo que contenía el 30-40% de 1-butanol (v/v). Las fases de acetato de etilo/1-butanol se combinaron y concentraron al vacío para proporcionar material de rebaudiósido C enriquecido. El rendimiento y contenido resultantes de la extracción líquido-líquido con acetona/agua y acetato de etilo/1-butanol se presentan en la tabla 3.

TABLA 3

Solvente para disolver el material de partida (proporción, v/v)	Solvente de extracción (proporción, v/v)	Contenido en Reb C	Rendimiento de recuperación de Reb C
Acetona/agua (20/80)	Acetato de etilo/1-butanol (65/35)	30,24%	79,38%
Acetona/agua (30/70)	Acetato de etilo/1-butanol (65/35)	31,95%	62,30%

20 En otra serie de experimentos, se disolvieron veinte gramos de material de partida en 500 ml de THF, que contenía 65-80 de agua (v/v). La solución se extrajo dos veces con 500 ml de acetato de etilo que contenía el 15% de 1-butanol (v/v). La fase de 1-butanol/acetato de etilo principalmente contenía compuestos menos polares y por tanto se descartó. Posteriormente, la fase de THF/agua se extrajo adicionalmente dos veces con 500 ml de acetato de etilo que contenía el 30-40% de 1-butanol (v/v). Las fases de acetato de etilo/1-butanol se combinaron y concentraron al vacío para proporcionar material de rebaudiósido C enriquecido. El rendimiento y contenido resultantes de la extracción líquido-líquido con THF/agua y acetato de etilo/1-butanol se presentan en la tabla 4.

TABLA 4

Solvente para disolver el material de partida (proporción, v/v)	Solvente de extracción (proporción, v/v)	Contenido en Reb C	Rendimiento de recuperación de Reb C
THF/agua (20/80)	Acetato de etilo/1-butanol (65/35)	28,5%	61,98%
THF/agua (35/65)	Acetato de etilo/1-butanol (65/35)	29,27%	49,02%
THF/agua (30/70)	Acetato de etilo/1-butanol (70/30)	31,35%	70,35%
THF/agua (25/75)	Acetato de etilo/1-butanol (65/35)	28,02%	60,0%

30 Este análisis indicó que el mayor contenido y recuperación en rebaudiósido C se obtuvo cuando se usó THF/agua como el solvente para el material de partida, en donde la proporción de THF:agua estaba en el intervalo de 20-30:70-80. Además, este análisis indicó que una proporción adecuada de acetato de etilo:1-butanol estaba en el intervalo de 60-70:30-40.

Ejemplo 2: Purificación de rebaudiósido C

35

Se disolvieron veinte gramos de material de partida en 500 ml de mezcla THF/agua, que contenía el 70-80% de agua, preferiblemente el 75% (v/v). La solución resultante se extrajo dos veces con 500 ml de mezcla acetato de etilo/1-butanol (85/15, v/v). La capa de 1-butanol/acetato de etilo se eliminó.

- 5 Posteriormente, la fase de THF-agua se extrajo adicionalmente dos veces con 500 ml de mezcla acetato de etilo/butanol, que contenía el 30-40% de 1-butanol, preferiblemente el 35% (v/v). Las fases de acetato de etilo/butanol se estas dos extracciones se combinaron y se concentraron al vacío para proporcionar 8,70 g de material. El contenido de rebaudiósido C de este material alcanzó el 24,5% (tabla 5), determinado por análisis de HPLC.

10

TABLA 5

Tiempo de retención (minutos)	Identidad	Porcentaje del total
12,702	Desconocido	1,10
15,722	Desconocido	4,62
18,547	Desconocido	4,20
22,811	Desconocido	1,06
24,473	Rebaudiósido A	16,73
24,931	Esteviósido	25,26
25,780	Desconocido	0,15
26,197	Rebaudiósido F	2,81
26,968	Rebaudiósido C	24,50
27,562	Dulcósido A	3,44
27,951	Desconocido	0,22
28,579	Isómero de esteviósido	3,71
30,543	Rubusósido	9,20
32,216	Desconocido	2,72
33,485	Esteviolbiósido	0,26

15

Usando una mezcla acetona/agua, que contenía del 10% al 20% de agua (en peso), preferiblemente el 15%, se observó que el material de extracción líquido-líquido era adecuado para recristalización. Se mezclaron cinco gramos de material de extracción líquido-líquido (contenido en rebaudiósido C del 24,5%) con 2,75 g de acetona/agua (15/85, p/p), y la mezcla se calentó a 48°C. La solución transparente obtenida se enfrió a temperatura ambiente (es decir, 19-22°C) y se agitó durante 4 días. La solución se filtró para recoger el precipitado blanco, que posteriormente se lavó con acetona y se secó al vacío a 50°C durante 8 horas. Se observó que el material recristalizado (0,9 g) tenía un contenido en rebaudiósido C del 76,98% (tabla 6), determinado por análisis de HPLC. Además, el rendimiento de recuperación de rebaudiósido C era del 56,6%.

20

TABLA 6

Tiempo de retención (minutos)	Identidad	Porcentaje del total
18,712	Desconocido	2,34
24,363	Rebaudiósido A	6,82
24,781	Esteviósido	6,59
26,193	Rebaudiósido F	0,85
27,015	Rebaudiósido C	76,98
27,557	Dulcósido	0,75
27,995	Desconocido	0,39
28,578	Isómero de esteviósido	0,92
30,566	Rubusósido	0,76
31,325	Rebaudiósido B	2,08

25

La pureza del rebaudiósido C se pudo aumentar adicionalmente mediante una segunda recristalización. La segunda recristalización implicó mezclar 2 gramos del material resultante de la primera recristalización con 27,5 g de 1-butanol/agua (97/3, p/p), y calentar la mezcla a 78°C. La solución transparente obtenida se enfrió a temperatura ambiente (es decir, 19-22°C) y se dejó reposar durante 2 días. La solución se filtró para recoger el precipitado blanco, que se lavó posteriormente con acetona y se secó al vacío a 50°C durante 8 horas. La segunda cristalización dio 1,1 gramos de material con un contenido en rebaudiósido C del 93,0% (tabla 7), determinado por HPLC. Además, el rendimiento de recuperación fue del 78,7% (tabla 8).

30

TABLA 7

Tiempo de retención (minutos)	Identidad	Porcentaje del total
24,082	Rebaudiósido A	5,30%
26,530	Rebaudiósido C	93,0%
27,599	Dulcósido A	0,37%
32,201	Desconocido	1,38%

5 Además, la pureza del rebaudiósido C se pudo incrementar adicionalmente incluyendo un paso de lavado. El paso de lavado implicó mezclar 5 gramos del material resultante de la primera recristalización con 100 gramos de acetona/agua (85/15, p/p), y calentar la mezcla a 58°C. La mezcla se sometió a reflujo durante 2 horas y se enfrió a temperatura ambiente (es decir, 19-22°C) y se dejó reposar durante 16 horas. La solución se filtró para recoger el sólido blanco, que posteriormente se lavó con acetona y se secó en un horno de vacío a 50°C durante 8 horas. El paso de lavado dio 3,6 gramos de material con un contenido en rebaudiósido C del 91,1% (tabla 8), determinado por HPLC. Además, el rendimiento de recuperación fue del 84,3%.

10

TABLA 8

Tiempo de retención (minutos)	Identidad	Porcentaje del total
25,362	Rebaudiósido A	3,63
25,641	Esteviósido	0,68
26,264	Rebaudiósido F	0,83
26,658	Rebaudiósido C	91,12
27,048	Dulcósido	1,75
27,419	Isómero de esteviósido	0,65
29,825	Desconocido	1,35

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar rebaudiósido C que comprende
 - 5 (a) extraer un material que comprende rebaudiósido C y reducido en rebaudiósido A con una solución de acetato de etilo y 1-butanol;
 - (b) retener la fracción soluble en acetato de etilo y 1-butanol;
 - (c) poner en contacto la fracción soluble en acetato de etilo y 1-butanol con una solución de acetona y agua para recristalizar el rebaudiósido C; y
 - 10 (d) recoger el rebaudiósido C recristalizado purificando de esta manera el rebaudiósido C.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la proporción de acetato de etilo:1-butanol es 60-70:30-40.
3. El método de la reivindicación 1, o de la reivindicación 2, en donde la proporción de acetona:agua es 80-15 90:10-20.
4. El método de la reivindicación 1, o de la reivindicación 2, o la reivindicación 3, en donde el material que contiene rebaudiósido C y reducido en rebaudiósido A comprende tetrahidrofurano y agua.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en donde la proporción de tetrahidrofurano:agua es 20-30:70-80.
6. El método de la reivindicación 1, o de cualquier reivindicación precedente, que comprende además los pasos previos de extraer el material que contiene rebaudiósido C y reducido en rebaudiósido A con una primera 25 solución de acetato de etilo:1-butanol (80-90:10-20) y desechar la fracción soluble en acetato de etilo:1-butanol.
7. El método de la reivindicación 1, o de cualquier reivindicación precedente, que comprende además someter el rebaudiósido C recristalizado a una segunda recristalización.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, en donde la segunda recristalización comprende una solución de 1-butanol:agua (97:3).
9. El método de la reivindicación 1, o de cualquier reivindicación precedente, que comprende además lavar el rebaudiósido C recristalizado con una solución de acetona:agua (85:15).
- 35