

Étude du taux des principaux constituants de la fleur de tilleul (*Tilia platyphyllos Scop*) d'origine française.

Investigation of principal constituents level in blossom linden (*Tilia platyphyllos Scop*) grown in France.

Dr Edmond BOURNY

Affiliation

LPPAM - Avenue de la Gare B.P. 47 - 26 170 Buis les Baronnies - France

Correspondance

Dr Edmond BOURNY

Phone : 0 33 04 75 28 08 02 / Fax : 0 33 04 75 28 08 10

Avenue de la Gare B.P. 47 - 26 170 Buis les Baronnies - France

E-mail : edmond.bourny@wanadoo.fr

Le tilleul (*Tilia platyphyllos* var. *Scopoli* et *Tilia cordata* var. *Miller*) est une herbe populaire en Europe. Les fleurs de tilleul sont produites à grande échelle comme plantes médicinales par plusieurs producteurs en France. On ne dispose d'aucune donnée sur les composants de ces produits commercialisés. Le but de cette étude était d'évaluer et de comparer la composition chimique de 21 lots commerciaux de tilleul d'origine française provenant de différentes zones dans les environs de Buis-les-Baronnies et du Puy-en-Velay à des fins de standardisation. Les échantillons de ces lots commerciaux ont été choisis dans des localités ayant différents types et degrés de conditions climatiques ainsi que des altitudes différentes. Dans cette étude, nous avons analysé la composition chimique (acides phénoliques – flavonoïdes – tanins – huiles essentielles – flavonols aglycones – proanthocyanidols) de la fleur de tilleul. Nous avons identifié et quantifié les principaux constituants chimiques du tilleul par chromatographie liquide haute performance (CLHP) et colorimétrie (spectrophotométrie en UV Visible). L'intérêt grandissant pour l'activité biologique puissante des acides phénoliques végétaux et des flavonoïdes souligne la nécessité de déterminer leur teneur dans le tilleul.

Linden (*Tilia platyphyllos* var. *Scopoli* and *Tilia cordata* var. *Miller*) is a popular herb in Europe. Linden flower blossom have been produced as a medicinal plant in large commercial scale in French by several producers. There is no report concerning the compounds present in these marketed products. The aim of this work was to investigate and to compare the chemical composition of 21 batches of linden flower from French commercial origin collected from different area near Buis les Baronnies and Puy en Velay for its standardization. The sampling commercial samples were chosen to cover localities with different types and degrees of climatic conditions as well as different altitudes. In this study, we have analyzed the chemical composition (phenolics acids – flavonoids – tannins – yield essential oils – flavonol aglycone – proanthocyanidol) of linden blossom. We identified and quantified the main chemical constituents of linden by high performance liquid chromatography (HPLC) and colorimetric methods. The increasing interest in powerful biological activity of plants phenolics and flavonoids outlined the necessity of determining their contents in linden.

MOTS CLÉS : *Tilia platyphyllos* var. Scop. – Tiliaceae – huiles essentielles – acides phénoliques – flavonoïdes – tanins – CLHP – CPG – méthode colorimétrique – proanthocyanidols – farnésol – glycosides de kaempférol – glycosides de quercétine – flavonoïdes – polyphénols.

I - INTRODUCTION

Le genre Tilleul comprend plus de 60 espèces réparties dans les zones tempérées et subtropicales de l'hémisphère Nord. Les fleurs de tilleul, *Tilia cordata* var. Mill. et *Tilia platyphyllos* var. Scop., sont largement utilisées en Europe à des fins médicinales. Ces dernières années, les fleurs de tilleul sont largement commercialisées comme produits de phytothérapie en Europe sous forme de sédatifs (sédatifs non narcotiques) et de tranquillisants et comme compléments alimentaires dans le monde pour les troubles du sommeil ou l'anxiété [6, 14, 25]. Les tilleuls sont largement cultivés en France et leurs inflorescences apparaissent pendant l'été. Dans ces régions, les fleurs sont largement utilisées comme infusions. Les infusions de fleurs de ces espèces sont généralement considérées comme non toxiques [6].

Dans la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) [5], les inflorescences de *Tilia platyphyllos* Scop., de *Tilia cordata* Miller et de *Tilia vulgaris* Heyne sont admises comme espèces officinales. Les monographies de la Commission E allemande [] ont approuvé la fleur de tilleul, avec ou sans bractées, pour le traitement des rhumes et des toux liées aux rhumes. Les fleurs de tilleul sont utilisées en phytothérapie en raison de leurs effets antispasmodiques, sudorifiques, expectorants, diurétiques et sédatifs. Le tilleul est utilisé en médecine traditionnelle principalement comme sédatif non narcotique dans les troubles du sommeil ou l'anxiété.

Le tilleul est largement utilisé mais sa composition aromatique, flavonoïde et phénolique n'est pas connue avec précision. Dans la présente étude, nous avons évalué la composition qualitative et quantitative des principaux constituants aromatiques et polyphénoliques des fleurs de tilleul. Cette étude de leurs principaux constituants bioactifs contribuera à la compréhension scientifique des effets bénéfiques des plantes médicinales appartenant au genre *Tilia*. Il est bien établi que les métabolites secondaires jouent un rôle important dans la défense chimique des végétaux. Le genre *Tilia* est une source importante de métabolites secondaires actifs.

KEYWORDS : *Tilia platyphyllos* var. Scop. – Tiliaceae – essential oil - phenolics acids – flavonoids – Tannins - HPLC – CPG – colorimetric method - Proanthocyanidol – Farnesol – Kaempferol glycosides – quercetin glycosides – flavonoids – polyphenols.

I - INTRODUCTION

Linden genus comprise more than 60 species spread in temperate and subtropical climatic zones of the Northern hemisphere. The flowers of linden tree, *Tilia cordata* var. Mill. and *Tilia platyphyllos* var. Scop., otherwise know as lime tree flowers, are used for medicinal purposes and are widely used in Europe. In recent years, the linden blossom have been widely sold as a phytomedicine in Europe as sedatives (non-narcotic sedative) and tranquilizers and as a dietary supplement worldwide for sleep disorder or anxiety [6,14,25]. Lindens are largely cultivated in France and the inflorescence appeared during the summer. In these areas, the flowers are largely used as herbal tea for their linden flowers. Flowers infusions of this species have generally been regarded as non-toxic [6].

In The European Pharmacopoeia (EP) [5], the inflorescence of *Tilia platyphyllos* Scop, *Tilia cordata* Miller and *Tilia vulgaris* Heyne are accepted as officinal species. The German Commission E Monographs [6] has approved linden flower, with or without bracts, for the treatment of colds and cold related coughs. Linden flowers have been used in phytotherapy, as they have antispasmodic, sudorific, expectorant, diuretic and sedative effects. Linden tree is used in traditional medicine primarily as a non-narcotic sedative for sleep disorders or anxiety.

The linden is widely used but its aromatics, flavonoids and phenolics composition is not precisely known. In the present study we have evaluated the qualitative and quantitative composition of the major aromatics and polyphenolics compounds from linden flowers. This investigation of their major bioactive constituents will contribute to the scientific understanding of the beneficial effects of the medicinal plants in the genus *Tilia*. It is well established that the secondary metabolites play an important role in plant chemical defense. The genus *Tilia* has been an important source of secondary metabolites which have activity.

Dans la Ph. Eur., les essais proposés pour l'analyse des substances officinales sont principalement basées sur leurs propriétés macroscopiques et microscopiques. Il existe par ailleurs aussi une technique de chromatographie sur couche mince (CCM) dans la monographie, qui est basée sur la détection des constituants flavonoïdes. En utilisant le mélange d'Acide formique/Eau/Méthyl Ethyl Cétone/ Acétate d'éthyle (10v/10v/30v/50v) comme phase mobile et l'acide caféique, la rutine et l'hypéroside comme produits de référence, on fait migrer la plaque en conditions standardisées puis on visualise les flavonoïdes au moyen d'un réactif ester aminoéthylique d'acide diphenylborique/MeOH à 365nm. La plaque est évaluée d'après la couleur caractéristique des taches et les distances de migration relatives par rapport à celles des produits de référence. Mais dans tous les cas, la résolution de cette technique semble ne pas être suffisante pour détecter les flavonoïdes ayant une valeur Rf quasi identique.

Le but de la présente étude est d'élucider la composition chimique des fleurs de tilleul françaises et de déterminer le profil phénolique de l'extrait méthanolique de *Tilia platyphyllos* Scop. Cela est utile pour évaluer la variabilité éventuelle de l'herbe d'origine française en fonction de la zone géographique. Les espèces de *Tilia* sont riches en constituants bioactifs, qui contribuent à une vaste gamme de propriétés médicinales. La valeur médicinale des végétaux réside dans leurs constituants phytochimiques tels que les tanins, les flavonoïdes et les autres composés phénoliques, qui produisent une action physiologique définie sur le corps humain. La présente étude a donc été conçue pour évaluer le potentiel de *T. platyphyllos* var. Scop dans le but de contribuer à en rechercher des utilisations bénéfiques. Les Malvaceae, y compris le genre *Tilia*. La teneur en mucilage et la composition de la fleur de tilleul sont bien documentées [7-8]. Le but de la présente étude est d'examiner le mucilage des fleurs de *Tilia platyphyllos* Scop. de 21 lots d'origine française (S1 à S21). Une méthode de détermination gravimétrique du mucilage des fleurs de tilleul a été développée et validée pour appliquer la méthode à 21 lots. Jusqu'à présent, seuls les polysaccharides des fleurs avaient fait l'objet d'une analyse approfondie [7-8-9-10].

In EP, tests given for the analysis of officinal drug are mainly based on the macroscopic and microscopic features. Moreover, there is also a thin-layer chromatographic (TLC) technique in the monograph, which based on the detection of flavonoid components. Using the mixture of EtOAc-HCO₂H C₂H₅OCH₃-H₂O (50:10:30:10) as mobile phase and caffeic acid, rutin and hyperoside as reference compounds, the plate is migrated under standardized conditions, and the flavonoids are then visualized by diphenylboric acid aminoethyl ester/MeOH reagent at 365 nm. The plate is evaluated according to the characteristic color of spots and relative migration distances compared with those of reference compounds. But in all cases, the resolution of this technique seems not sufficient to detect flavonoids with nearly identical R_f-value.

The aim of the present study is to elucidate the chemical composition of French linden flowers and to determine a phenolic profile of methanolic extract of *Tilia platyphyllos* Scop.. This is helpful to investigate any area variability of the herb grown in French. *Tilia* species are rich in bioactive constituents, which contribute to a wide range of medicinal properties. The medicinal value of plants lie their phytochemicals components such, tannins, flavonoids and other phenolic compounds, which produce a definite physiological action on the human body. Therefore, the present work has been designed to evaluate the potential *T. platyphyllos* var. Scop with a view to contributing to the search for beneficial uses. flowers from *Tilia platyphyllos* Scop of 21 batches from French origin (S1 to S21). A gravimetric method determination of linden flowers mucilage was developed and validated to apply the method at 21 batches from different French origins. Up to present, only the blossom polysaccharides have been intensively analyzed [7-8-9-10].

II - EXPÉRIENCE

1. Matériel végétal et protocole

Les fleurs de tilleul sont des produits commerciaux. Vingt-et-un échantillons de marque ont été achetés dans les campagnes françaises. Les fleurs de tilleuls ont été récoltées dans différentes régions de France au cours des mois de juin et juillet 2007, près de Buis-les-Baronnies (marques S1 à S14 et S19 à S20) et du Puy-en-Velay (marques S15 à S18). Tous les échantillons commerciaux avaient été récoltés au stade de la floraison. Les matériels végétaux (1 kg de fleurs de tilleul séchées) ont été identifiés comme étant *Tilia platyphyllos* Scop. et *Tilia cordata* Miller et authentifiés par le Dr Edmond BOURNY, laboratoire LPPAM. Les plantes ont été conservées à température ambiante jusqu'à l'extraction, à l'abri de la lumière.

2. Produits chimiques

Les réactifs et les solvants utilisés étaient de qualité analytique ou de qualité CLHP et ils ont été achetés auprès de Merck (Allemagne). Les étalons (acide chlorogénique, rutine, quercétine, acide rosmarinique, isoquercitrine, astragaline) ont été achetés auprès de Sigma (St. Louis, Minnesota, Etats-Unis), d'Extrasynthèse (Saint-Genay, France) et de Phytoflan Diehm & Neuberger GmbH (Allemagne). Toutes les solutions ont été préparées le jour de l'expérience et conservées à 4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

3. Appareil de CLHP et conditions chromatographiques

3.1. Teneur en polyphénols.

La teneur en polyphénols a été déterminée conformément aux méthodes rapportées [9-10] au moyen d'un appareil de CLHP (HITACHI) composé d'une pompe quaternaire, d'un échantillonneur automatique et d'un détecteur à barrette de diodes (DBD). Les spectres UV ont été acquis automatiquement pour tous les pics

II - EXPERIMENTAL

1. Plant material and protocol

Linden flowers were commercial products. 21 samples of trademarks were purchased from the farmland in France. Linden blossoms were harvested from different area in France during June-July 2007, near Buis les Baronnies (Trademark S1 to S14 and S19 to S20) and Puy en Velay (Trademark S15 to S18). All commercial samples were collected at the flowering stage. The plant materials (1 kg of dried linden blossom) were identified as *Tilia platyphyllos* Scop and *Tilia cordata* Miller, and authenticated by Dr. Edmond BOURNY, LPPAM Laboratory. The plants were stored at ambient temperature until extraction, protected from the light.

2. Chemicals

The reagents and the solvents used were of analytical or HPLC grade and were purchased from Merck Compagny (Germany). Standards (chlorogenic acid, rutin, quercetin, rosmarinic acid, isoquercitrin, astragaline) were purchased from Extrasynthèse (Saint-Genay, France) and Phytoflan Diehm & Neuberger GmbH (Germany) and Sigma (St. Louis, MO, USA). All the solutions were prepared on the day of the experiment, kept at 4°C, and protected from the light until use.

3. HPLC apparatus and chromatographic conditions

3.1. Polyphenolic content.

The polyphenolic content was determined according to reported methods [4] by an HPLC apparatus (HITACHI) consisting of a quaternary pump, an autosampler, and a Photodiode Array Detector (PDA). UV spectra were automatically acquired for all peaks (range – nm, 2 nm step). Separation was carried with a C18 column (4.6 mm x 250 mm) PUROSPHER STAR VWR, 5 µm particle size. Acid acetic 5 % (solution A) and acetonitril (solution B) were used as mobile

Tableau 1 / Table 1 - Programme de gradient CLHP / HPLC gradient program

| Temps/ time (minutes) | Solution A ¹ (%) | Solution B ² (%) | Elution |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 0 - 10 | 98 | 2 | Equilibration |
| 10 - 40 | 98 ⇒ 70 | 2 ⇒ 30 | Gradient linéaire /Linear gradient |
| 40 - 50 | 70 | 30 | Isocratique / Isocratic |

¹ Solution A : acide acétique à 5 % / acid acetic 5 %

² Solution B : acétonitrile / acetonitril

(gamme – nm, paliers de 2 nm). La séparation a été réalisée sur une colonne C18 (4,6 mm x 250 mm) PU-ROSPHER STAR VWR, avec une taille de particules de 5 µm. L'acide acétique à 5 % (solution A) et l'acétonitrile (solution B) ont été utilisés comme phases mobiles. Le programme de gradient est présenté dans le tableau 1. Le débit était de 1,0 ml/min et la température de la colonne de 25 °C (+/- 1 °C). Le volume d'injection était de 20 µl. Les profils CLHP sont présentés à la figure 1. L'identité a été confirmée par la comparaison des spectres UV des pics individuels avec ceux des étalons (facteurs d'appariement > 99,5). Des mesures en triple ont été réalisées et les valeurs moyennes ont été calculées. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

3.2. Extraction des flavonoïdes du tilleul.

Environ 1 g (pesé exactement à 0,0001 g) de la plante complète pulvérisée a été extrait avec 90 ml de méthanol/eau (70/30, v/v) comme solvant sous reflux pendant 30 min. Après filtration, le filtrat a été complété à 100,0 ml avec le même solvant. Les échantillons ont été filtrés sur des membranes filtrantes de 0,45 µm (Millipore) puis scellés et conservés dans des flacons en verre sombre au réfrigérateur à 4 °C dans l'attente de l'analyse. La quantification des principaux constituants a été effectuée à partir des courbes d'étalonnage des chromatogrammes CLHP obtenus avec les composés authentiques. L'acide chlorogénique (> 98 %, CLHP), acheté auprès de Sigma (St. Louis, Minnesota, Etats-Unis), a été utilisé comme étalon externe. Le pourcentage de composés non identifiés dans les échantillons a été calculé comme étant de l'acide chlorogénique. La teneur en phénols totaux a été calculée comme la somme des phénols individuels identifiés (calculés comme étant la substance de référence) et des phénols individuels non identifiés (calculés en équivalent acide chlorogénique) détectés par CLHP.

3.3. Teneur en flavonols aglycones totaux (kaempférol, quercétine, myricétine).

La teneur en flavonols aglycones totaux a été déterminée conformément aux méthodes rapportées [24]. La quantité totale de dérivés quercétine, kaempférol et myricétine dans chaque échantillon a été obtenue par hydrolyse acide et détermination par CLHP des aglycones obtenus. Les profils CLHP sont présentés à la figure 2. L'identité a été confirmée par la comparaison des spectres UV des pics individuels avec ceux des étalons (facteurs d'appariement > 99,5). La teneur en flavonols aglycones totaux a été calculée comme

phases. The gradient program is shown in Table 1.

The flow rate was 1,0 ml/min and the column temperature was 25 °C (+/- 1°C). The injection volume was 20 µl.

HPLC profile are shown in Fig 1.

Fig. 1: HPLC polyphenolic profile of methanol extract of *Tilia platyphyllos* Scop. Detection: 370 nm.

1 : Acide gallique; 2: Acide protocatéchique; 3: I; 4: Acide chlorogénique; 5: H; 6: Acide caféique; 7: Acide syringique; 8: D; 9: F; 10: Acide p-coumarique; E; 11; 12: Rutine ; 13: Hypéroside; 14: Isoquercitrine; 15: Kaempféritrine; 16: Quercitrine + Astragaline; 17: ; 18: Afzelin; 19: J; 20: Tiliroside trans ; 21: Quercetin ; 22: Tiliroside cis.

The identity was confirmed comparing the UV-spectra of individual peak with those of standards (match factors better than 99,5). Triplicate measurements were taken and mean values were calculated. The results are given in Table 3.

3.2. Extraction of flavonoids from linden.

About 1 g (accurately weighed to 0,0001 g) of powdered whole plant was extracted using 90 ml methanol/water (70:30, v/v) as solvent under reflux during 30 min. After filtration, the filtrate was adjusted to 100,0 ml with the same solvent. The sample were filtered using 0,45 µm membrane filters (Millipore), sealed and kept in dark glass vials in the refrigerator at 4°C for further analysis. Quantification of the main constituents of was carried out from the calibration curves of the HPLC chromatograms using reference compounds. Chlorogenic acid (> 98%, HPLC) purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) was used as an external calibration standard. The percentage of unidentified compounds in the samples was calculated as chlorogenic acid. Total phenolic content were calculated as the sum of individual phenolic identified (calculated as their reference substance) and individual phenolic not identified (calculated as chlorogenic acid) detected by HPLC.

3.3. Total Flavonol aglycones content (Kaempferol, Quercetin, Myricetin)

The total flavonol aglycone content was determined according to reported methods [24]. The total amount of quercetin, kaempferol and myricetin derivatives in each sample was obtained by acid hydrolysis and HPLC determination of the resulting aglycones.

la somme des aglycones individuels identifiés (calculés comme étant la substance de référence) détectés par CLHP. La courbe d'étalonnage a été préparée par la préparation de solutions de référence de quercétine, de kaempférol et de myricétine à diverses concentrations dans du méthanol R. Le volume d'injection était de 20 µl. Les profils CLHP sont présentés à la figure 1. L'identité a été confirmée par la comparaison des spectres UV des pics individuels avec ceux des étalons (facteurs d'appariement > 99,5). La teneur en flavonoïdes aglycones totaux a été calculée comme la somme des flavonoïdes individuels détectés par CLHP (calculés comme étant de la substance de référence). Des mesures en triple ont été réalisées et les valeurs moyennes ont été calculées. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

The identity was confirmed comparing the UV-spectra of individual peak with those of standards (match factors better than 99,5). Total Flavonol aglycones content were calculated as the sum of individual aglycones identified (calculated as their reference substance) detected by HPLC. The calibration curve was prepared by preparing quercetin, kaempferol and myricetin reference solutions at various concentrations in methanol R.

The injection volume was 20 µl. Separation was carried with a C18 column (4.6 mm x 125 mm) PUROSPHER STAR VWR, 5 µm particle size. Phosphoric acid 0.3 g/l % (solution A) and Methanol (solution B) were used as mobile phases. The gradient program is shown in Table 2. HPLC profile are shown in Fig 2.

Triplicate measurements were taken and mean values were calculated. The results are given in Table 3.

Tableau 2 / Table 2 - Programme de gradient CLHP / HPLC gradient program

| Temps/ time (minutes) | Solution A ¹ (%) | Solution B ² (%) | Elution |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 0 - 1 | 60 | 40 | Equilibration |
| 1 - 20 | 60 ⇒ 45 | 40 ⇒ 55 | Gradient linéaire / Linear gradient |
| 20 - 24 | 45 ⇒ 0 | 55 ⇒ 100 | Gradient linéaire / Linear gradient |
| 24 - 30 | 0 | 100 | Isocratique / Isocratic |

¹ Solution A : acide phosphorique (0,3 g/l, ajusté à pH 2,0 avec de l'acide phosphorique) / Acid phosphoric (0,3 g/l, adjusted to pH 2,0 with acid phosphoric)

² Solution B : méthanol / methanol

3.4. Extraction des flavonoïdes aglycones du tilleul (24).

Un gramme d'inflorescence complète pulvérisée a été extrait sous reflux avec 90 ml d'HCl (4N)/MeOH R (1/4) (v/v) pendant 30 minutes. Après refroidissement, le mélange a été transféré dans une fiole conique de 100,0 ml et complété au volume avec le méthanol R. Après centrifugation et filtration, 20 µl du surnageant ont été soumis à une analyse par CLHP-UV.

3.4. Extraction of flavonoids aglycone of linden (24).

One gramme of powdered whole inflorescence was extracted and refluxed with 90 ml of HCl (4N): MeOH R (1:4) (v/v) for 30 minutes. After cooling, the mixture was transferred into a 100,0 ml volumetric flask and made up to the volume with methanol R. After centrifugation and filtration, 20 µl of the supernatant was subjected to HPLC-UV analysis.

4. Mesures spectrophotométriques.

Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible (UVIKON XL SECOMAN 225 double faisceau), France.

4.1. Détermination des flavonoïdes totaux.

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée par spectrophotométrie, le chlorure d'aluminium hexahydraté formant un complexe de couleur jaune qui peut être mesuré dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 420 nm [1]. Environ 1 g (pesé exactement à 0,0001 g) de la plante complète pulvérisée a été extrait avec 90 ml de méthanol sous reflux pendant 30 min. Après filtration, le filtrat a été complété à 100,0 ml avec du méthanol. 5,0 ml de l'échantillon ont été mélangés avec 5,0 ml de chlorure d'aluminium à 2 %. Il est resté à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance du mélange réactif a été mesurée à 420 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible. La courbe d'étalonnage a été préparée par la mesure d'absorbance de solutions d'isoquercitrine à diverses concentrations dans du méthanol R. Le coefficient de corrélation a été supérieur à 0,999. Des mesures en triple ont été réalisées et les valeurs moyennes ont été calculées. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

4.2. Détermination de la teneur en proanthocyanidines.

Conformément à la procédure d'Hiermann et coll. [2], des fleurs de tilleul pulvérisées ($b = 1,0$ g) ont été mélangées à température ambiante avec de l'acétone R-H₂O R (7/3) pendant 15 min. Après filtration, le mélange a été dilué à 100,0 ml avec de l'acétone R à 70 % v/v. Une portion de cette solution (10,0 ml) a été évaporée à siccité à température ambiante et du n-BuOH/HCl à 37 % (95/5) a été ajouté. Le mélange a été chauffé à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, le mélange a été dilué à 100,0 ml et l'extinction E a été mesurée par spectrophotométrie à 500 nm. La courbe d'étalonnage a été préparée par la préparation de solutions de chlorure de cyanidine à diverses concentrations dans du n-BuOH. Le coefficient de corrélation a été supérieur à 0,999. La teneur en procyanidines totales (PT %) a été estimée sous forme de chlorure de cyanidine. Des mesures en triple ont été réalisées et les valeurs moyennes ont été calculées.

4.3. Détermination des phénols totaux.

La teneur en phénols totaux a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu, comme décrit

4. Spectrophotometric measurements.

Spectrophotometric measurements were performed by UV-visible spectrophotometer (double-beam), France.

4.1. Determination of Total flavonoids.

The total flavonoid content was determined by spectrophotometric method with aluminium chloride hexahydrate forming a yellow complex which one can be measured in a spectrophotometer at 420 nm [1]. About 1 g (accurately weighed to 0,0001 g) of powdered whole plant was extracted using 90 ml methanol under reflux during 30 min. After filtration, the filtrate was adjusted to 100,0 ml with methanol. 5,0 ml of sample was mixed with 5,0 ml of 2 % aluminium chloride. It remained at room temperature for 30 min. The absorbance of the reaction mixture was measured at 420 nm with UV-Visible spectrophotometer. The calibration curve was prepared by preparing isoquercitrin solutions at various concentrations in methanol R. The correlation coefficient was superior to 0,999. Triplicate measurements were taken and mean values were calculated. The results are given in Table 3.

4.2. Determination of the proanthocyanidin content.

According to the procedure of Hiermann et al. [2], the powdered linden blossom ($b = 1,0$ g) was stirred at room temperature with acetone R-H₂O R (7:3) for 15 min. After filtration the mixture was diluted to 100,0 ml with 70 % acetone R v/v. A portion of this solution (10,0 ml) was evaporated to dryness at room temperature and n-BuOH-HCl 37 % (95-5) was added. The mixture was heated under reflux for 2 hour. After cooling, the mixture was diluted to 100,0 ml and the extinction E was spectrophotometrically measured at 500 nm. The calibration curve was prepared by preparing cyaniding chloride solutions at various concentrations in n-BuOH. The correlation coefficient was superior to 0,999. The content of Total Procyanidins (TP %) was estimated as cyaniding chloride. Triplicate measurements were taken and mean values were calculated.

4.3. Determination of total phenolics.

Total phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu reagent as previously described [12]. Total phenol concentration was determined spectrophotometrically according to the Folin-Ciocalteu colorimetric method [4]. About 1 g (accurately weighed to 0,0001g) of powdered linden blossom was extracted

précédemment [12]. La teneur en phénols totaux a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu [4]. Environ 1 g (pesé exactement à 0,0001g) de fleurs de tilleul pulvérisées a été extrait avec 200 ml d'eau sous reflux pendant 30 min. Après filtration, le filtrat a été complété à 25 ml avec de l'eau. 5 ml de l'échantillon ont été dilués au 1/5e avec de l'eau. 5 ml de l'échantillon ont été mélangés avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) et complétés à 50 ml avec du carbonate de sodium (150 g/l) après ajout de 10 ml d'eau. Après 2 min à température ambiante, l'absorbance à 745 nm a été mesurée. L'acide gallique a été utilisé pour construire une courbe d'étalonnage. Les résultats ont été exprimés en équivalents d'acide gallique par g de poids sec (GAE/g poids sec). Des mesures en triple ont été réalisées et les valeurs moyennes ont été calculées. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

5. Essai de pureté.

Qualité physique :

La perte à la dessiccation et les cendres totales ont été déterminées par les méthodes officielles décrites dans la Pharmacopée Européenne [5].

5.1. Teneur en eau :

La teneur en eau a été déterminée par la mesure de la perte de masse à 103 °C (+/- 2 °C) dans une étuve pendant 4 heures. Des mesures en triple ont été réalisées et les valeurs moyennes ont été calculées [5]. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

5.2. Cendres totales :

Un gramme de l'échantillon a été incinéré dans un creuset en porcelaine et placé dans un four à moufle [5] à 550 °C (+/- 25 °C) pendant 5 heures. Le produit obtenu a été refroidi et pesé afin de déterminer les cendres totales. Des mesures en triple ont été réalisées et les valeurs moyennes ont été calculées. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

5.3. Matières extractibles (teneur en solides solubles).

Une quantité de 200,0 ml d'eau distillée chaude (95 °C) a été ajoutée à 5,0 g (+/- 0,001 g) de feuilles de tilleul préalablement pulvérisées. Après 10 minutes, le surnageant a été filtré sous vide et refroidi à température ambiante (environ 25 °C). La teneur en solides solubles a été déterminée dans 25,0 ml à poids constant à 105 °C (+/- 2 °C) dans une étuve. Une seule mesure a été utilisée pour l'analyse. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

with 200 ml of water under reflux during 30 min. After filtration, the filtrate was adjusted to 25 ml with water. 5 ml of sample was diluted to 1/5 with water. 5 ml of sample was mixed with 1 ml Folin-Ciocalteu reagent (FCR) and adjusted with sodium carbonate (150 g/L) to 50 ml. After 2 min. at room temperature, the absorbance at 745 nm was measured. Gallic acid was used for calibration of a standard curve. The results were expressed as Gallic Acid Equivalents per g of dry weight (GAE/g dry weigh). Triplicate measurements were taken and mean values were calculated. The results are given in Table 3.

5. Purity test.

Physical quality :

loss on drying and total ash were determined by the official method described in European Pharmacopoeia [5].

5.1. Moisture content.

Moisture content was determined by measuring the loss in mass at 103°C (+/- 2 °C) in a oven for 4 hours. Triplicate measurements were taken and mean value are calculated [5]. The results are given in Table 3.

5.2. Total ash :

One gram of sample were calcined in a porcelain capsule and put into a muffle furnace [5] at 550 °C (+/- 25 °C) for 5 hours. Then, the material was cooled and weighed in order to determine total ash. Triplicate measurements were taken and mean values were calculated. The results are given in Table 3.

5.3. Matter extractable (soluble solids content).

A quantity of 200,0 ml of hot distilled water (95 °C) was added to 5,0 g (+/- 0,001 g) of linden blossom which had been previously ground to powder. After ten minutes, the supernatant was filtered under vacuum and cooled to room temperature (25°C approximately). The soluble solids content was determined from 25,0 ml to constant weight at 105° C (+/- 2°C) in an oven. One determination was used for analysis. The results are given in Table 3.

6. Hydrodistillation des huiles essentielles.

Les inflorescences de tilleul ont été broyées et soumises à une distillation à la vapeur (300,0 g de matière sèche d'inflorescences) pendant 8 heures, au moyen d'un appareil de type Clevenger sans xylène à une vitesse de 3-4 ml/min, conformément à la Pharmacopée Européenne [5]. Les distillats volatils ont été analysés par CPG-SM. Le rapport fleurs/eau a été de 1/10. Les huiles essentielles ont été conservées dans des flacons en verre ambré à -20 °C jusqu'à analyse. Les huiles essentielles étaient de couleur jaune, avec une odeur agréable forte. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

6.1. Appareil de CPG et conditions chromatographiques.

Les compositions en huiles essentielles ont été déterminées par CPG/SM. Les analyses ont été réalisées au moyen d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse utilisant un appareil Varian couplé à un ordinateur équipé d'un poste de travail Star et d'un spectromètre de masse opérant avec un impact d'électrons de 70 eV. L'instrument fonctionne dans les conditions suivantes. La colonne est une colonne capillaire de 30 m (CP-Sil 8 CB, Varian), avec un diamètre intérieur de 0,25 mm et une épaisseur de film de 0,25 µm, en silice fondue. Programmation de la température : la température du four a été programmée à 35 °C pendant l'injection, puis augmentée de 35 °C à 180 °C à la vitesse de 4 °C/min. Le gaz vecteur hydrogène a été délivré à débit contrôlé constant de 2,5 ml/min. Injection : un injecteur capillaire opérant à 250 °C en mode split (1/100); un détecteur à ionisation de flamme (FID) opérant à 250 °C ; spectres de masse. Les composants ont été identifiés à la fois par leurs temps de rétention par CPG et par la comparaison de leur masse avec celles présentes dans la banque de données informatique et les spectres publiés. La quantification a été effectuée par la surface en pourcentage, facteur de réponse du FID = 1. L'analyse qualitative s'est basée sur la comparaison des indices de rétention et des spectres de masse avec les données correspondantes dans la littérature et les bibliothèques de spectres de masse. Les résultats sont présentés dans le [tableau 3](#) ?

6. Essential oil hydrodistillation.

The linden inflorescences were ground and submitted to steam distillation (300,0 g of dried material of inflorescences) for 8 hours, using a Clevenger-type apparatus without xylene at a rate of 3-4 ml/min, according European Pharmacopoeia [5]. The volatile distillates were analyzed by GC-MS. The ratio of the blossom and water was 1:10. The essential oils were stored in glass amber vials at -20 °C until they were analyzed. The essential oils were yellow in color, with a strong pleasant odor. The results are given in Table 4.

6.1. CPG apparatus and chromatographic conditions.

The essential oil compositions were determined by GC/MS. Analysis were performing using a gas chromatograph using a Varian coupled to a computer equipped with a STAR WORKSTATION and a mass spectrometer operating at electron impact 70 eV. The instruments operates at the following conditions. The column was a 30 m (CP-Sil 8 CB, Varian) capillary column with a internal diameter of 0,25 mm and a film thickness of 0,25 µm, was fused silica capillary column. Temperature programme: The oven temperature programming was 35 °C during injection and then increased from 35°C to 180°C at the rate of 4°C/min, The hydrogen carrier gas had a delivery rate of controlled constant flow at 2,5 ml/min. Injection; a capillary injector operating at 250°C in the split mode (1:100); a flame ionization detector (FID) running at 250°C; mass spectra. Components were identified by both GC retention times and by comparison of their mass with those present in the computer data bank and published spectra. Quantification was performed by area percent, FID-response factor = 1. The qualitative analysis was based on the comparison of the retention indexes and the mass spectra with corresponding data in the literature and computer mass spectra libraries. The results are given in [Table 4](#) ?

ÉCHANTILLONS COMMERCIAUX / TRADEMARK

TABLEAU 3 / TABLE 3

| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lot / batch | 801087 | 801088 | 801089 | 801090 | 801091 | 801092 | 801093 | 801094 | 801095 | 801096 | 801097 | 801098 | 801099 | 801100 | 801101 | 801102 | 801103 | 801104 | 801105 | 801106 | 801107 |
| (1) | 0.639 (1.47) | 0.821 (4.16) | 0.825 (3.88) | 1.026 (3.11) | 0.64 (1.35) | 1.082 (1.08) | 1.121 (0.13) | 0.919 (0.17) | 0.941 (4.86) | 0.684 (1.62) | 0.843 (2.72) | 1.107 (2.62) | 0.852 (3.39) | 0.654 (4.19) | 1.136 (1.23) | 0.91 (1.45) | 0.779 (0.21) | 0.933 (2.24) | 0.957 (1.05) | 0.756 (0.94) | 1.013 (0.67) |
| (2) | 0.247 | 0.377 | 0.388 | 0.485 | 0.261 | 0.412 | 0.424 | 0.34 | 0.442 | 0.277 | 0.42 | 0.418 | 0.339 | 0.261 | 0.433 | 0.311 | 0.366 | 0.532 | 0.371 | 0.49 | 0.404 |
| (3) | 0.158 | 0.2 | 0.113 | 0.206 | 0.219 | 0.251 | 0.247 | 0.195 | 0.202 | 0.203 | 0.239 | 0.266 | 0.172 | 0.138 | 0.143 | 0.139 | 0.191 | 0.177 | 0.177 | 0.17 | 0.23 |
| (4) | 0.00004 | 0.0001 | 0.0011 | 0.0052 | 0.00006 | 0.0011 | 0.00002 | 0.0003 | 0.0021 | 0.0048 | 0.005 | 0.005 | 0.0047 | 0.0039 | 0.002 | 0.0011 | 0.0023 | 0.0043 | 0.0043 | 0.01 | 0.000003 |
| (5) | 0.404 (4.35) | 0.577 (4.32) | 0.502 (4.65) | 0.696 (5.23) | 0.48 (1.17) | 0.664 (4.1) | 0.671 (1.89) | 0.535 (3.34) | 0.646 (3.72) | 0.485 (2.18) | 0.664 (0.42) | 0.689 (5.68) | 0.516 (4.99) | 0.403 (1.55) | 0.578 (4.63) | 0.451 (0.56) | 0.559 (3.99) | 0.713 (2.74) | 0.586 (4.87) | 0.655 (4.84) | 0.404 (4.96) |
| (6) | 0.431 (0.3) | 1.03 (-0.13) | 0.82 (0.25) | 0.88 (0.16) | 0.747 (0.27) | 0.84 (0.43) | 1.131 (0.27) | 0.881 (0.27) | 0.893 (0.21) | 1.129 (0.34) | 0.952 (4.6) | 1.041 (0.13) | 0.802 (0.14) | 0.726 (0.14) | 1.425 (0.06) | 1.193 (4.06) | 0.947 (0.08) | 1.609 (0.21) | 1.189 (0.19) | 0.726 (0.19) | 1.005 (0.9) |
| (7) | 1.351 (0.06) | 1.792 (0.02) | 1.544 (7.1) | 2.026 (0.06) | 1.669 (0.1) | 1.696 (0.02) | 2.321 (0.34) | 2.395 (0.49) | 2.463 (0.07) | 3.038 (0.19) | 1.887 (1.27) | 1.827 (4.2) | 1.569 (0.31) | 1.557 (0.09) | 2.563 (0.04) | 2.125 (0.02) | 2.566 (1.14) | 2.411 (2.18) | 2.008 (3.39) | 2.283 (0.03) | 2.137 (0.38) |
| (8) | 17.45 | 22.83 | 26.13 | 26.89 | 17.84 | 26.83 | 27.52 | 24.15 | 24.84 | 27.33 | 26.56 | 24.74 | 21 | 25.34 | 28.81 | 15.42 | 25.86 | 22.54 | 24.65 | 25.27 | 25.94 |
| (9) | 11.2 (0.22) | 10.14 (0.18) | 9.99 (0.13) | 6.7 (0.11) | 10.74 (0.08) | 9.2200000 (0.09) | 10.82 (0.12) | 10.63 (0.23) | 11.07 (0.07) | 8.15 (0.08) | 10.43 (0.14) | 9.69 (0.2) | 10.14 (0.11) | 8.7799999 (0.1) | 12 (0.07) | 7.76 (0.11) | 9.1999999 (0.12) | 12.66 (0.05) | 11.85 (0.04) | 11.53 (0.13) | 11.54 (0.14) |
| (10) | 6.69 (0.20) | 6.1 (0.06) | 5.48 (0.23) | 6.29 (0.15) | 6.36 (0.04) | 5.33 (0.19) | 5.42 (0.16) | 5.68 (0.03) | 6.13 (0.15) | 6.26 (0.14) | 5.96 (0.05) | 5.8 (0.13) | 5.89 (0.05) | 6.66 (0.15) | 4.88 (0.11) | 5.74 (0.01) | 5.47 (0.05) | 5.69 (0.13) | 5.41 (0.37) | 5.62 (0.16) | 5.62 (0.06) |

- (1) Teneur en flavonoïdes totaux (% m/m sur matière sèche) Méthode Spectrophotométrique. / (1) Content of total flavonoids (% of dry weight) Spectrophotometric Method
(2) Teneur en Quercetin (% m/m sur matière sèche) / Méthode HPLC. / (2) Content of quercetin (% of dry weight) HPLC method
(3) Teneur en Kaempferol (% m/m sur matière sèche) Méthode HPLC. / (3) Content of Kaempferol (% of dry weight) HPLC method
(4) Teneur en Myricetin (% m/m sur matière sèche) Méthode HPLC. / (4) Content of Myricetin (% of dry weight) HPLC method
(5) Teneur en flavonoïdes totaux (% m/m sur matière sèche) Méthode HPLC (somme des flavonoïdes aglycones quercetin, kaempferol, et myricetin) / (5) Content of total flavonoids HPLC method (% of dry weight) (sum of flavonoids as aglycone quercetin, kaempferol and myricetin)
(6) Teneur en proanthocyanidol (% m/m sur matière sèche) Méthode spectrophotométrique. / (6) Content of Proanthocyanidol (% of dry weight) Spectrophotometric method
(7) Teneur en composés phénoliques totaux (% m/m sur matière sèche) Méthode spectrophotométrique / (7) Content of total phenolic (% of dry weight) Spectrophotometric method
(8) Teneur en matière soluble dans l'eau (% m/m sur matière sèche) / (8) Water-soluble extractible (% of dry weight), one determination
(9) Perte à la dessiccation (%) / (9) Loss on drying (%)
(10) Cendre totale / (10) Total ash (%)

Les valeurs entre parenthèses correspondent au coefficient de variation relatives RSD % (n=3) / Values in parentheses are relative standard deviations RSD % (n=3)

ÉCHANTILLONS COMMERCIAUX / TRADEMARK

TABLEAU 4 / TABLE 4

| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Lot / batch | 801087 | 801088 | 801089 | 801090 | 801091 | 801092 | 801093 | 801094 | 801095 | 801096 | 801097 | 801098 | 801099 | 801100 | 801101 | 801102 | 801103 | 801104 | 801105 | 801106 | 801107 |
| % abundance relative / % of relative abundance ¹ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2-phényléthanol | 0.141 | 0.013 | 0.35 | 0.163 | 0.14 | 0.55 | 0.25 | 0.077 | 0.127 | 0.112 | Nd3/3 | 0.606 | 0.075 | 0.134 | 0.035 | 0.09 | 0.06 | 0.165 | 0.295 | 0.03 | 0.3 |
| Linalol | 0.304 | 0.036 | 2.5 | 0.192 | 0.5 | 2.5 | 0.4 | 0.085 | 0.45 | 0.213 | 0.12 | 0.293 | 0.135 | 0.129 | 0.25 | 0.2 | 0.25 | 0.135 | 0.725 | 0.08 | 0.266 |
| Géranol | 0.072 | 0.014 | 0.53 | 0.027 | 0.11 | 0.05 | 0.12 | 0.013 | 0.077 | 0.017 | 0.095 | 0.057 | 0.012 | 0.019 | 0.013 | 0.04 | 0.02 | 0.005 | 0.14 | 0.011 | 0.055 |
| (Z) (E) farnésol | 0.067 | 0.105 | 0.127 | 0.076 | 0.065 | 0.128 | 0.36 | 0.367 | 0.126 | 0.121 | 0.095 | 0.16 | 0.245 | 0.187 | 0.195 | 0.075 | 0.2 | 0.2 | 0.165 | 0.278 | 0.155 |
| Octadécane | 0.87 | 0.336 | 0.2 | 0.1 | 0.42 | 0.19 | 0.33 | 0.287 | 0.075 | 0.288 | 1 | 0.113 | 0.31 | 0.45 | 0.465 | 0.72 | 0.13 | 0.15 | 0.51 | 0.145 | 0.45 |
| Kaurène-16 | 9.35 | 20.5 | 21.5 | 28 | 8.1 | 24.75 | 42 | 19.95 | 11.15 | 30.35 | 13.8 | 5.225 | 28.5 | 17.55 | 17.85 | 25.3 | 16.8 | 15.75 | 14.15 | 18.4 | 18.1 |
| Hénéicosanique | 8.25 | 6.45 | 6.75 | 8.5 | 4.3 | 1.65 | 8.8 | 2.87 | 6.15 | 5.75 | 10.45 | 6.25 | 6.35 | 7.3 | 7.8 | 9.7 | 8.3 | 9.05 | 7.75 | 11.65 | 10.5 |
| Docosane | 1.4 | 1.27 | 0.185 | 1.4 | 0.65 | 0.32 | 1.47 | 0.24 | 0.91 | 0.58 | 1.4 | 1 | 0.785 | 1.3 | 0.975 | 1 | 0.93 | 0.93 | 1.2 | 0.35 | 1.55 |
| Tricosane | 23.85 | 16.4 | 3.1 | 18.55 | 8.8 | 4.65 | 12.4 | 10.8 | 11.15 | 14.5 | 21.4 | 16.5 | 12.5 | 19.15 | 13.65 | 11.85 | 18.05 | 13.35 | 16.75 | 8.68 | 16.1 |
| Tétracosane | 1.35 | 1.37 | 1 | 1.35 | 0.85 | 0.44 | 1.2 | 0.95 | 0.97 | 1.17 | 1.65 | 1.3 | 1.15 | 1.55 | 1.15 | 0.9 | 1.15 | 1.15 | 1.15 | 0.75 | 1.15 |
| Pentacosane | 5.35 | 6.1 | 2.35 | 6.05 | 3.35 | 1.81 | 4.85 | 4.2 | 4.65 | 6 | 7.3 | 6.15 | 5.55 | 6.85 | 5.25 | 4.18 | 5.35 | 5.9 | 4.75 | 3.72 | 4.6 |
| Hexacosane | 0.18 | 0.246 | 0.14 | 0.169 | 0.11 | 0.08 | 0.23 | 0.187 | 0.154 | 0.209 | 0.215 | 0.24 | 0.275 | 0.275 | 0.185 | 0.15 | 0.155 | 0.197 | 0.13 | 0.126 | 0.155 |
| Heptacosane | 0.82 | 1.18 | 0.95 | 1 | 0.67 | 0.89 | 1.05 | 1 | 0.87 | 1 | 1.3 | 1.1 | 1.18 | 1.45 | 1.35 | 0.95 | 0.92 | 1.32 | 0.85 | 0.8 | 0.75 |
| Total⁴ / Sum⁴ | 52.00 | 54.02 | 39.68 | 65.58 | 28.10 | 38.01 | 35.70 | 41.03 | 36.86 | 60.31 | 58.83 | 38.99 | 57.07 | 56.34 | 49.17 | 55.16 | 52.32 | 48.3 | 48.57 | 45.02 | 54.13 |
| Huile essentielle² / Essential oil² | 0.0932 | 0.0546 | 0.0634 | 0.064 | 0.0641 | 0.0641 | 0.0462 | 0.0789 | 0.0728 | 0.114 | 0.0622 | 0.0687 | 0.079 | 0.1115 | 0.0954 | 0.059 | 0.0909 | 0.0773 | 0.0882 | 0.1027 | 0.0728 |

¹ Une détermination basée sur le pourcentage d'aire de chaque pic / ¹ Based on percentage of the area of each peak, one determination.

² Une détermination, pourcentage d'huile essentielle (% v/m) / ² Percentage of essential oil (% v/w), one determination.

³ N.d. : Non détecté / ³ N.d. : Not detected

⁴ une détermination, somme des aires des pics identifiés (%) / ⁴ Sum of area peak identified (%), one determination.