

# Étude de la teneur et de la composition en mucilage de la fleur de tilleul (*Tilia platyphyllos Scop*) d'origine française.

**Investigation of mucilage content and composition  
in linden flower (*Tilia platyphyllos Scop*) grown in France.**

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 est caractérisé par une concentration en mucilage élevée (3-10 % du poids sec) dans ses fleurs. Le mucilage, glucide complexe présentant une grande capacité à absorber l'eau, doit être considéré comme une source potentielle d'hydrocolloïde industriel. Les résultats ont montré des différences non significatives de teneur en mucilage entre les divers lots. La teneur en mucilage varie entre 5,7 % et 10,2 %. Le polysaccharide brut hydrosoluble issu de l'inflorescence de *Tilia* est composé de L-arabinose (1,39 % à 2,98 %), de D-galactose (2,66 % à 9,03 %), de L-rhamnose (1,13 % à 6,70 %) et d'une quantité minimale de L-mannose (0,36 % à 0,65 %), de D-glucose (0,75 à 1,55 %) et de D-xylose (0,33 % à 0,54 %).

**MOTS CLÉS :** Teneur en mucilage, polysaccharide, arabinose, galactose, rhamnose, xylose, *Tilia platyphyllos Scop.*, fleurs de tilleul, sucre, CLHP, indice de gonflement, méthode gravimétrique.

Linden have high mucilage concentrations (3-10 % dry weight) in their blossom. Mucilage, a complex carbohydrate with a great capacity to absorb water, should be considered as a potential source of industrial hydrocolloid. The mucilage content vary from 5,7 % to 10,2 %. The water soluble crude polysaccharide from *Tilia* inflorescence is composed of L-arabinose (1,39 % to 2,98 %), D-galactose (2,66 % to 9,03 %), L-rhamnose (1,13 % to 6,70 %) and minor amount of L-mannose (0,36 % to 0,65 %), D-glucose (0,75 to 1,55 %) and D-xylose (0,33 % to 0,54 %).

**KEYWORDS :** Mucilage content, polysaccharides, Arabinose, Galactose, Rhamnose, Xylose, *Tilia platyphyllos Scop.*, Linden blossoms, sugar, HPLC, Swelling Index, Gravimetric method, Quantitative determination.

## I - INTRODUCTION

Dans la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.), les inflorescences de *Tilia platyphyllos Scop.*, de *Tilia cordata Miller* et de *Tilia vulgaris Heyne* sont admises comme espèces officinales [1]. 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 [2]. Les fleurs de tilleul, *Tiliae flos*, sont utilisées en phytothérapie en raison de leurs effets antispasmodiques, sudorifiques, expectorants, diurétiques et sédatifs. Les propriétés pharmaceutiques de la fleur de tilleul sont attribuées à ses composants chimiques : flavonoïdes, huile volatile, tannins et polysaccharides du mucilage [2-4-5-6].

Les hydrocolloïdes polysaccharidiques, dont le mucilage, sont abondants dans la nature et on les trouve couramment dans de nombreuses plantes supérieures. Les polysaccharides constituent une classe de macromolécules biologiques, structurellement diverses, dotées d'un vaste éventail de propriétés physico-chimiques qui sont largement utilisées pour des applications en pharmacie et en médecine [8]. Compte tenu de la concentration élevée de groupes hydroxyle dans le polysaccharide, le mucilage a généralement une capacité de fixation de l'eau élevée, ce qui a amené à conduire des études sur son rôle dans la rétention d'eau de la plante. Dans la plupart des cas, ses fonctions physiologiques sont incertaines ; il peut servir de substance de réserve ou contribuer à l'équilibre hydrique et/ou à la résistance au dessèchement. Il a été suggéré que la capacité d'hydratation du mucilage pourrait offrir aux plantes un mécanisme pour résister à la sécheresse [17]. Le tilleul est bien adapté et il a une capacité importante à résister à une sécheresse prolongée. La capacité du tilleul à retenir l'eau dans des conditions climatiques aussi défavorables est due, au moins en partie, à la capacité de fixation de l'eau du mucilage. Le mucilage contribue à réguler la teneur cellulaire en eau au cours de la phase initiale de la déshydratation. Il a également été suggéré que le mucilage joue un rôle prédominant dans l'économie de l'ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) de la plante.

Les substances mucilagineuses sont largement présentes dans 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 pré-

## I - INTRODUCTION

In the European Pharmacopoeia (EP), the inflorescence of *Tilia platyphyllos Scop.*, *Tilia cordata Miller* and *Tilia vulgaris Heyne* are accepted as officinal species [1]. The German Commission E Monographs has approved linden flower, with or without bracts, for the treatment of colds and cold related coughs [2]. Linden flowers, *Tiliae flos*, have been used in phytotherapy, as antispasmodic, sudorific, expectorant, diuretic and sedative effects. The pharmaceutical properties of the linden flower are attributed to its chemical compounds: flavonoids, volatile oil, tannins and mucilage polysaccharides [2-4-5-6].

Polysaccharide hydrocolloids including mucilage are abundant in nature and are commonly found in many dicotyledone. The polysaccharides constitute a structurally diverse class of biological macromolecules with a broad range and physicochemical properties which are widely used for applications in pharmacy and medicine [8]. Although linden mucilage can occur in high concentrations in different plant organ (Inflorescence, leaf, buds and wood). Due to the high concentration of hydroxyl groups in the polysaccharide, mucilage generally have a high water-binding capacity. Many studies have been made of their role in plant-water relation. In most cases its physiological function is uncertain; it may serve as reserve substances or contribute to the moisture balance and/or resistance to drought [17]. It has been suggested that the ability of mucilage to hydrate may offer a mechanism for plants to resist drought. Linden are well adapted and have a marked capacity to withstand prolonged drought. The ability of linden to retain water under such unfavourable climatic conditions is due in part, at least, to the water-binding capacity of mucilage. The mucilage helps regulate the cellular water content during the initial phase of deshydration. It has also suggested that the mucilage has a predominant role in the  $\text{Ca}^{2+}$  economy of the plant.

Mucilaginous substances have been reported as occurring widely in the Malvaceae, including the genus *Linden*. Lime tree flower mucilage content and composition is well documented [7-8]. The aim of the present study is to elucidate the analyse the mucilage of flowers from *Tilia platyphyllos Scop* of 21 batches from French origin (S1 to S21). A gravimetric method deter-

sente 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].

## II - MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Des fleurs de tilleuls matures ont été récoltées dans différentes régions de France au cours des mois de juin et juillet 2007, près de Buis-les-Baronnies (Drôme, 26) et de Puy-en-Velay (Haute-Loire, 43). Tous les échantillons commerciaux avaient été récoltés au stade de la floraison. Vingt-et-un échantillons de marque ont été achetés dans les campagnes françaises<sup>1</sup>. Les matériels végétaux (1 kg de fleurs de tilleul séchées) ont été identifiés comme étant *Tilia platyphyllos Scop.* et authentifiés par le Dr Edmond BOURNY du laboratoire LPPAM. Les fleurs de tilleul étaient des produits du commerce. Les plantes ont été conservées à température ambiante jusqu'à l'extraction, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

### 2. Produits chimiques

Les réactifs et les solvants utilisés étaient de qualité analytique ou de qualité CLHP et ils ont été achetés auprès de la société Merck, en France.

### 3. Teneur en mucilage

#### Protocole pour la détermination du mucilage des fleurs de tilleul

Les fleurs de tilleul séchées ont été pulvérisées et passées sur un tamis de porosité 0,25 mm. L'échantillon a été homogénéisé en mélangeant la poudre obtenue dans un mélangeur cubique pendant 20 minutes. Le matériau pulvérulent a été pré-extrait à l'éthanol. Ce pré-traitement a été réalisé avec 100 ml d'éthanol (96%) dans un bain-marie à 80 °C pendant 45 minutes dans un condenseur à reflux. Le lavage préliminaire à l'éthanol a été effectué afin d'éliminer de manière sélective les autres macromolécules avant l'extraction, telles que les pigments de chlorophylle, de coaguler les protéines à la chaleur, tout en désactivant les enzymes susceptibles de dégrader les polysaccharides. La centrifugation a été effectuée à 4000 rpm pendant 20 minutes afin de séparer le matériau brut. La poudre a été séchée toute une nuit dans une hotte à extraction ventilée afin de garantir l'évaporation de tout l'éthanol.

mination 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 - MATERIALS AND METHODS

### 1. Plant material

The mature linden blossom were harvested from different area in France during June-July 2007, near Buis les Baronnies (Drôme - 26) and Puy en Velay (63). All commercial samples were collected at the flowering stage. They were purchased 21 samples of trademarks from the farmland in France. The plant materials (1 kg of dried linden blossom) were identified as *Tilia platyphyllos Scop.* and authenticated by Dr. Edmond BOURNY, LPPAM Laboratory. Linden flowers were commercial products. The plants were stored at ambient temperature until extraction, protected from the light and moisture.

### 2. Chemicals

The reagents and the solvents used were analytical or HPLC grade quality and were purchased from Merck Company, Germany.

### 3. Mucilage content

#### Protocol for the determination of the mucilage of linden flowers

Dried linden blossom were powdered and passed through a 0,25 mm pore size sieve. The sample is homogenized by mixing the powder obtained in a cube blender for 20 minutes. The powdered material was pre-extracted with ethanol. This pre-treatment is carried out with 100 ml ethanol (96%) in a water bath at 80° C, for 45 minutes with a reflux condenser. Preliminary washing in ethanol at a temperature of 80° C for 45 minutes is carried out to eliminate selectively other macromolecules before extraction, such as chlorophyll pigments, coagulate proteins by heat, whilst deactivating enzymes which could degrade the polysaccharides. Centrifugation is carried out at 4,000 rpm for 20 minutes to separate the raw material. The powder is dried for one night in a ventilated extraction hood to ensure that all the ethanol is evaporated off.

2,5 grams of powdered material is extracted with 200 ml of distilled water in a round bottom flask surmount with a reflux condenser, a magnetic bar and heated on

2,5 grammes de matériau pulvérulent ont été extraits avec 200 ml d'eau distillée R sous reflux. L'extraction a été réalisée à 70 °C pendant 4 heures. Après centrifugation (4000 rpm pendant 20 minutes) et afin d'améliorer le rendement de l'extraction du mucilage, un lavage du marc par 50 ml d'eau distillée a été réalisé. La solution de lavage a été ajoutée à la solution d'extraction. Les extraits ont été regroupés et concentrés à moins de 60 °C avec un évaporateur rotatif sous pression réduite.

Le polysaccharide a été précipité par l'ajout d'éthanol à 96 % (4 fois le volume de l'extrait aqueux). Le précipité a été laissé au repos toute la nuit au réfrigérateur à 4 °C. Le mucilage précipité a été séparé par filtration, séché à masse constante à 40 °C et soumis à une détermination gravimétrique. Le test a été réalisé en double et la valeur moyenne a été enregistrée, comme le montre le Tableau 1.

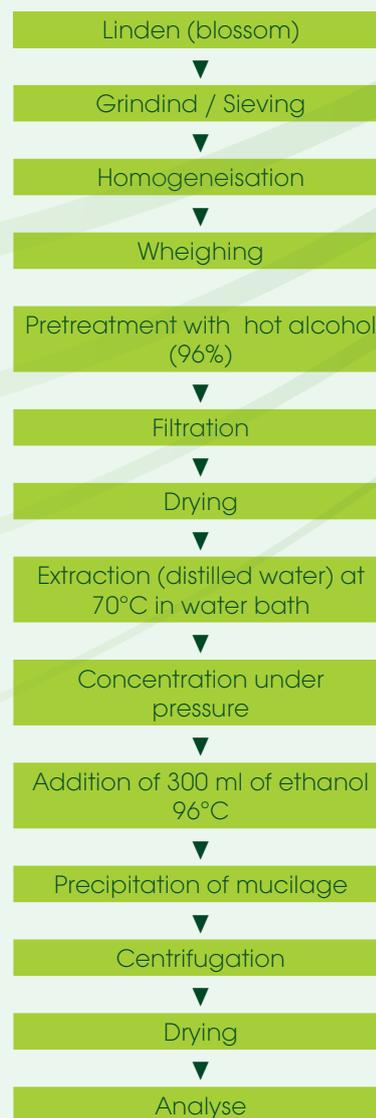
**Figure 1 :** Schéma de fabrication pour la détermination de la teneur en mucilage



a hot plate stirrer. The extraction was carried out at 343.15 °K (70° Celsius) during 4 hours. After centrifugation (4,000 rpm for 20 minutes), in order to improve the yield from the mucilage extraction, the marc is washed with 50 ml of distilled water. This enabled us to increase the yield. The washing solution is added to the extraction solution. The extracts were combined, concentrated was done below 333.15 °K (60 °C) with a rotary flash evaporator under reduced pressure.

The polysaccharide was precipitated by addition of 95% ethanol (4 times the volume of aqueous extract). The precipitate was allowed to settle over night in the refrigerator at 4°C. The precipitated mucilage was separated by filtering, dried to constant weight at 40 °C and determined gravimetrically. The test was carried out in duplicate and the average value of swelling index was recorded as show in Table 1.

**Figure 1 :** Process flow diagram for mucilage content.



#### 4. Indice de gonflement Ph. Eur. (2.8.4)

Les caractéristiques de gonflement de la poudre de mucilage ont été étudiées dans l'eau R dans un éprouvette graduée bouchée. Un gramme de poudre a été humecté avec 0,5 ml d'éthanol (95 %) et complété au volume à 25 ml avec de l'eau R. Le cylindre a été agité vigoureusement toutes les 10 min pendant 1 h et laissé à reposer pendant 3 h. Le volume occupé par la poudre de mucilage a été mesuré. Le test a été réalisé en triple et la valeur moyenne de l'indice de gonflement a été enregistrée dans le Tableau 1.

#### 5. Hydrolyse acide du mucilage pour l'analyse des sucres

L'hydrolyse des polysaccharides a été effectuée conformément à la méthode d'analyse modifiée, publiée en tant que norme ISO 11292 en 1995 [15]. L'hydrolyse acide du mucilage brut a été effectuée en ajoutant 50 ml de HCl 1,0 N à 0,15 g de mucilage broyé dans une fiole jaugée de 100 ml. Placer la fiole dans un bain-marie bouillant à 100 °C (pH ~ 1) pendant 2,5 heures. Maintenir toujours le niveau de l'eau dans le bain-marie au-dessus du niveau de la solution dans la fiole. Agiter manuellement le contenu de la fiole toutes les 30 min. Refroidir la fiole à température ambiante sous l'eau du robinet. Diluer au volume avec de l'eau R. Après l'hydrolyse, les ions chlorure qui interfèrent avec la mesure sont éliminés par passage sur une cartouche DIONEX Onguard Ag II. La solution est ensuite filtrée sur un filtre à membrane de porosité 0,2 µm avant l'injection dans le système de chromatographie en phase liquide.

#### 6. Chromatographie d'échange d'anions à haute performance couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD)

Les glucides ont été déterminés par chromatographie d'échange d'anions à haute performance couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD), selon la méthode ISO 11292 modifiée. L'identification et la quantification des glucides ont été effectuées par comparaison avec des solutions étalons. La technique est simple et sensible et elle permet la séparation complète de tous les glucides en un seul cycle, elle convient donc à l'analyse de routine. Nous avons utilisé un système chromatographique DIONEX composé d'une pompe à gradient (AGP1), d'un détecteur électrochimique (PED 2) avec une électrode de travail en or et une électrode de référence Ag/AgCl, d'un injecteur automatique (AS40) avec des flacons de 5 ml, d'un système de dérivation post-colonne (PC 10) et d'un four à colonne (ALLTECH Gecko 2000) réglé à 30 °C.

#### 4. Swelling index. PE (2.8.4)

Mucilage powder swelling characteristics was studied in distilled water R in a capped graduated cylinder. One gramme of powder was moistened with 0,5 ml ethanol (95 %) and volume was made up to 25 ml with water R. The cylinder was shaken vigorously every 10 min for 1 hour and allowed to stand for 3 h. The volume occupied by mucilage powder was measured. The test was carried out in triplicate and the average value of swelling index was recorded as show in Table 1.

#### 5. Acid hydrolysis of mucilage for sugar analysis

Hydrolysis of the polysaccharides was done according to the modified method of analysis, published as ISO standard 11292 in 1995 [15]. Acid hydrolysis of the raw mucilage was performed by adding 50 ml of 1,0 N HCl to 0,15 g of ground mucilage in a 100ml volumetric flask. Place flask in a boiling water bath at 373.15 °K (100 °C) (pH ~ 1) for 2,5 hours. Always keep water level in bath higher than the solution level in flask. Stir by hand flask contents every 30 min. Cool flask to room temperature under tap water. Dilute to volume (100 ml) with H<sub>2</sub>O R. Following hydrolysis, chloride ions interfering with measure are removed by passage through a DIONEX Onguard Ag II cartridge. The solution is then filtered through 0,2 µm membrane filter prior to injection onto LC system.

#### 6. Anion-exchange chromatographic method coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)

Carbohydrates were determined using high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), according to modified method ISO 11292. Identification and quantification of carbohydrates were done by comparison with standard solutions. The technique is simple and sensitive and allows complete separation of all carbohydrates in one run and, therefore, is suitable for routine analysis. We used a DIONEX chromatographic system consisting of a gradient pump (AGP1), an electrochemical detector (PED 2) with gold working electrode and Ag/AgCl reference electrode, an automatic injector (AS40) with 5 ml vials, a post-column derivatization system (PC 10), and a column oven (ALLTECH Gecko 2000) set to 303.15 °K (30 °C). Carbohydrates have been separated on a pellicular anion-exchange column (DIONEX Carbopac PA1 - 250 mm x 4 mm i.d.) packed with a 10 µm diameter polystyrene divinylbenzene substrate agglomerated with

Les glucides ont été séparés sur une colonne échangeuse d'anions de type pelliculaire (DIONEX Carbopac PA1 – 250 mm x 4 mm d.i.) remplie d'un substrat de polystyrène divinylbenzène de 10 µm de diamètre aggloméré avec des microbilles de latex, fonctionnalisés par des groupements ammonium quaternaires, réticulé à 5 %, avec une colonne de protection remplie du même matériau que la colonne analytique (50 x 4 mm d.i.). Conditions opératoires : isocratiques (voir tableau pour les conditions relatives à la phase mobile) ; température de la colonne : 30 °C ; débit : 1,0 ml/min ; solvant post-colonne : NaOH 300 mM à 0,5 ml/min ; réglages du détecteur : forme de l'onde des glucides, potentiels optimisés fournis par le fabricant. Les solutions mères de glucides ont été préparées en diluant les sucres dans des fioles jaugées séparées avec de l'H<sub>2</sub>O. Des solutions étalons de glucides mélangés ont été préparées par une nouvelle dilution des solutions mères de glucides afin d'obtenir des concentrations de glucides similaires à celles retrouvées lors des tests préliminaires réalisés dans les solutions échantillons de tilleul hydrolysées.

**Tableau 1** : Conditions des éluants pour la détermination des glucides par chromatographie d'échange d'anions couplée à une détection ampérométrique pulsée.

Temps, min	Eluant A, %	Eluant B, %
0,0	100	0 (début de l'acquisition)
50,0	100	0 (arrêt de l'acquisition)
50,1	0	100 (début du lavage de la colonne)
65,0	0	100 (arrêt du lavage de la colonne)
65,1	100	0 (début du rééquilibrage)
80,0	100	0 (arrêt du rééquilibrage)

Eluant A : H<sub>2</sub>O ultra-pure

Eluant B : NaOH 300 mM préparé à partir de NaOH 50 % (JT Baker)

micro beads of quaternary amine functionalized latex, 5 % cross-linked, with a guard column packed with the same material as analytical column (50x4 id mm). Operating conditions: Isocratic (see table for mobile phase conditions); column temperature 303.15 °K (30 °C); flow rate: 1.0 ml/min; postcolumn solvent : 300 mM NaOH at 0,5 ml/min; detector settings: carbohydrate waveform, optimized potentials as provided by manufacturer. Carbohydrate stock solutions were made by diluting sugars in separate volumetric flasks with H<sub>2</sub>O. Mixed carbohydrates standard solutions were made by further dilution of carbohydrates stock solutions in order to reach carbohydrate concentrations similar to those found during preliminary tests in hydrolysed linden sample solutions.

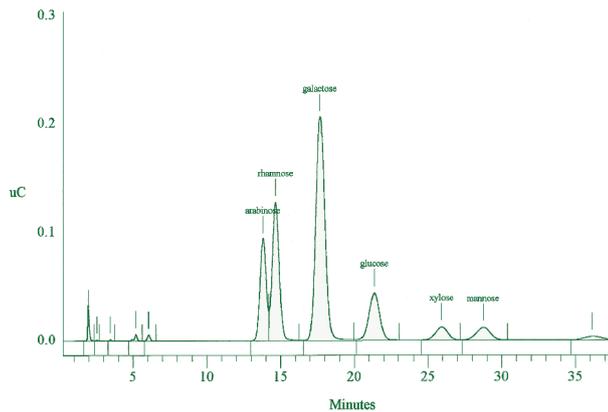
**Table 1** : Eluants conditions for the determination of carbohydrates by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection.

Time, min	Eluant A, %	Eluant B, %
0,0	100	0 (Start acquisition)
50,0	100	0 (Stop acquisition)
50,1	0	100 (start column wash)
65,0	0	100 (Stop column wash)
65,1	100	0 (Start reequilibration)
80,0	100	0 (Stop reequilibration)

Eluant A : ultra-pure H<sub>2</sub>O

Eluant B : 300 mM NaOH prepared from 50 % NaOH (JT Baker)

**Figure 2 :** Chromatogramme HPAE-PAD type des glucides du tilleul



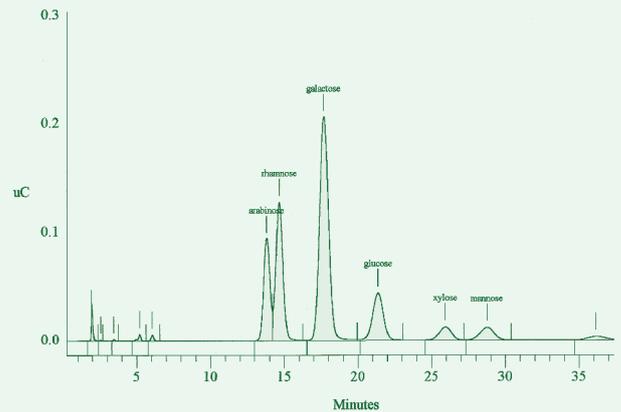
En utilisant un détecteur ampérométrique pulsé, une détection sensible des glucides dissous dans l'éluant d'eau pure est impossible, car les composés neutres ne sont pas oxydables en conditions neutres. En utilisant un réactif de NaOH supplémentaire, les glucides ont pu être transformés en leur forme anionique. Les glucides séparés dans un premier temps sur la colonne avec uniquement de l'eau pure ont été transformés dans un second temps en leur forme anionique en conditions basiques (ajout de NaOH post-colonne, pH > 12). La séquence de voltage de l'ampérométrie pulsée rend possible de maintenir la surface de l'électrode en or exempte de résidus d'oxydation et de garantir une bonne réponse du détecteur. La colonne doit être lavée et régénérée par du NaOH concentré à la fin de chaque cycle afin de re-saturer la surface échangeuse d'ions par des ions OH<sup>-</sup> et de rendre possible la réalisation du prochain cycle de séparation par échange d'ions.

### III - RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 1. Teneur en mucilage

Les concentrations de mucilage ont été déterminées selon une méthode gravimétrique. Le protocole de la méthode de détermination est présenté à la Figure 1. Les fleurs séchées ont été écrasées et extraites avec de l'eau après traitement par de l'éthanol à chaud. Le mucilage brut ainsi obtenu a pu être précipité avec l'éthanol. Il a été séché sous pression réduite afin d'obtenir une poudre brunâtre. Les résultats de la détermination réalisée dans les différents lots de tilleul sont présentés dans le Tableau 1 (page 9). Le pourcentage de mucilage dans tous les lots est compris entre 5,7 % et 10,5 % du poids sec. Le rendement du mucilage récupéré, obtenu dans cette étude a, de fait, été plus élevé que les

**Figure 2 :** Typical HPAE-PAD chromatogram of linden carbohydrates



Using a pulsed amperometric detector, a sensitive detection of the carbohydrates dissolved in pure water eluent is impossible, because neutral compounds are not oxidizable under neutral conditions. By use of an additional NaOH reagent, the carbohydrates could be converted into the anionic form. Carbohydrates firstly separated on the column with only pure water were converted in a second step into the anionic form under basic conditions (NaOH post-column addition, pH > 12). Pulsed amperometry voltage sequence permits maintaining the gold electrode surface clean from oxidation residues and ensure a good detector response. The column must be washed and regenerated with concentrated NaOH at the end of each run to re-saturate the ion-exchange surface with OH<sup>-</sup> ions and make the next ion-exchange separation run possible.

### III - RESULTS AND DISCUSSION

#### 1. Mucilage content

Mucilage concentrations were determined according to a gravimetric method. The protocol for the determination method developed is given in Figure 1. The dried blossoms were grounded and extracted with water R after treatment with hot ethanol (95 %). The resulting crude mucilage could be precipitated with ethanol from the aqueous solution. It was dried under reduce pressure to give a brownish powder. The results of the determination of the different batches of linden are set out in table 1 (page 9). The percentage mucilage of all the batches range from 5.7 % to 10.5 % dry weight. The yield of recovered mucilage obtained in this study was indeed higher than data on mucilage

données sur la teneur en mucilage rapportées pour les espèces de *Tilia* [9-10]. La différence pourrait être attribuée à l'utilisation de différentes variétés de tilleul (variété Benivay, variété Le Géant, variété Mondé, etc.).

Les tilleuls avec peu de bractées semblent avoir des concentrations de mucilage moyennes légèrement plus élevées que ceux avec beaucoup de bractées, alors que l'indice de gonflement n'est pas directement lié à la concentration de mucilage. D'une manière générale, les variétés de tilleul avec beaucoup de bractées ont toutes produit une solution d'extraction visqueuse orange-jaunâtre et un mucilage blanc à doré. Les tilleuls avec une quantité moyenne de bractées produisent une solution d'extraction légèrement visqueuse, orange à brun, et un mucilage brun. Les tilleuls avec peu de bractées produisent des solutions d'extraction légèrement visqueuses ou non visqueuses. Par ailleurs, la couleur de la solution (jaunâtre-orange à brun) et celle du mucilage (brun à noir) varie selon le lot. Ces couleurs sombres pourraient indiquer des phénomènes d'altération par oxydation des composés phénoliques tels que les proanthocyanes.

On peut en outre noter que des concentrations élevées de mucilage ne sont pas nécessairement corrélées à une viscosité élevée de la solution d'extraction aqueuse. Il est admis que la viscosité d'une solution aqueuse de polysaccharides est associée à la structure chimique du polymère et, en particulier, à la longueur de la chaîne. On pourrait donc considérer que certaines fleurs pourraient contenir du mucilage à des concentrations similaires mais avec des structures originales différentes ou ayant été endommagées par un traitement négligent.

La viscosité des solutions aqueuses de mucilage de tilleul est significative. Par conséquent, une solution de 0,5 % de mucilage de *Tilia cordata* a une viscosité dynamique de 20 °C = 33,2 mPa. Cette valeur est dix fois plus élevée que celles obtenues pour d'autres plantes mucilagineuses telles que le fucus. Selon certains auteurs, les extraits aqueux des fleurs de *Tilia platyphyllos* sont beaucoup plus visqueux que ceux de *Tilia cordata* même si ces substances ont le même indice de gonflement en cas d'application de la méthode de mesure de la pharmacopée allemande 8 [14]. Une analyse de corrélation a montré qu'il n'y a pas de relation significative entre le pourcentage de mucilage et le facteur de gonflement. En règle générale, le facteur de gonflement augmentera avec l'augmentation du pourcentage de mucilage.

content reported for *Tilia* species [9-10]. The difference may be attributed to the use of different linden cultivar (Benivay cultivar's, Le Géant cultivar's, Mondé cultivar's, etc.).

Lindens with little bract would appear to have average mucilage concentrations slightly higher than those with much bract, whereas the swelling index is not directly related to mucilage concentration. From a general point of view, lindens cultivars with more bract all produced a yellowish-orange, viscous extraction solution and white to gold mucilage blanch. Lindens with medium bract produce a slightly viscous, orange to brown extraction and brown mucilage. Lindens with little bract produce slightly or non viscous extraction solutions. Furthermore, the colour of the solution (yellowish orange to brown) and that of the mucilage (brown to black) vary with the different batches. These dark colourings could indicate phenomena of alteration by oxidation of phenolics compounds, such as proanthocyanes.

Furthermore, it may be noted that high concentrations in mucilage is not necessarily correlated with high viscosity of the aqueous extraction solution. It is accepted that the viscosity of an aqueous solution of polysaccharides is associated with the chemical structure of the polymer and, in particular the length of chain. It may therefore be considered that some flowers could contain mucilage in similar concentrations but with different original structures or damaged structures due to careless treatment.

The viscosity of aqueous solutions of mucilage of linden is significant. Therefore, a solution of 0.5 % of mucilage from *Tilia cordata* has a dynamic viscosity of 293.15 °K (20 °C) = 33.2 mPa. This value is ten times higher than those obtained with other mucilaginous plants, such as fucus. According to certain authors, aqueous extracts of flowers from *Tilia platyphyllos* are much more viscous than those of *Tilia cordata* although these drugs have the same swelling index when the measurement procedure of German Pharmacopoeia 8 [14] is applied. Correlation analysis showed that there is no significant relation between mucilage percentage and swelling factor. Generally, swelling factor will increase with mucilage percent.

Aqueous extract of polysaccharide are widely used in

Tableau 1 / Table 1

TILLEUL COMMERCIAL (TRADEMARK)																					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21
(1)	10.15 (4.80)	15.27 (2.12)	15.73 (9.04)	15.31 (4.27)	12.65 (2.83)	14.12 (7.20)	13.68 (7.23)	14.87 (5.22)	12.52 (4.42)	14.19 (5.20)	13.68 (4.80)	(17)	15.93 (1.32)	15.45 (4.06)	10.23 (5.05)	31.06 (4.33)	13.86 (12.48)	14.83 (1.63)	14.44 (7.84)	13.67 (7.84)	14.06 (4.94)
(2)	9.41 (5.04)	7.79 (6.81)	8.42 (0.76)	7.46 (1.630)	6.15 (0.69)	5.68 (10.07)	6.19 (10.05)	7.6 (4.65)	7.09 (5.89)	10.51 (5.25)	7.72 (2.84)	8.33 (3.99)	7.68 (0.55)	7.35 (2.89)	7.47 (4.07)	9.58 (6.94)	7.95 (4.45)	10.37 (1.57)	8.81 (8.03)	7.83 (3.43)	6.66 (5.95)
(3)	1.56	2.52	2.12	2.54	2.08	1.54	2.20	1.39							1.48	2.07	2.98	1.76	2.58	2.96	2.46
(4)	4.95	4.67	4.79	4.13	5.28	5.75	6.70	2.97							1.13	4.48	2.87	4.79	3.98	4.23	3.98
(5)	6.42	7.99	5.80	5.83	6.15	5.63	7.87	8.83							2.66	8.34	6.84	8.64	8.62	9.03	7.28
(6)	1.14	1.27	1.34	1.26	1.61	1.02	1.20	0.75	(17)	(17)	(17)	(17)	(17)	(17)	1.14	1.55	1.49	1.01	1.42	1.57	1.18
(7)	0.36	0.54	0.36	0.61	0.51	0.33	0.41	0.33							0.37	0.45	0.74	0.46	0.59	0.67	0.51
(8)	0.65	0.78	0.52	0.58	1.00	0.50	0.69	0.43							0.36	0.43	0.72	0.54	0.69	0.79	0.72
(9)	15.08	17.77	14.93	14.95	16.63	14.77	19.07	14.70							7.14	17.32	15.64	17.20	17.88	19.25	16.63
(10)	2.68	3.27	4.35	3.91	4.67	4.34	3.91	2.87	3.87	4.23	4.04	3.65	3.33	4.32	4.59	5.00	5.66	3.57	2.73	3.28	2.59
(11)	0.39	0.60	0.92	1.04	1.18	1.38	1.04	0.93	0.92	1.22	0.89	0.97	0.48	1.01	0.96	0.93	1.13	1.25	0.55	0.68	0.63
(12)	1.91	2.37	3.23	3.33	4.14	4.70	3.33	2.64	3.08	3.10	3.44	3.21	2.63	3.00	3.97	4.71	4.75	3.22	2.07	2.26	2.03
(13)	0.77	3.83	7.01	4.54	5.17	5.72	4.54	2.42	4.27	4.17	7.03	4.53	1.29	4.81	8.36	3.54	10.02	5.99	1.14	4.97	2.86
(14)	6.34	1.79	3.29	4.48	7.47	5.17	4.48	3.23	5.01	4.34	6.01	4.28	4.42	4.77	7.09	6.13	8.36	4.67	2.94	3.36	2.68
(15)	0.17	0.23	0.21	0.28	0.30	0.28	0.28	1.16	0.32	0.35	0.28	0.24	0.26	0.30	0.32	0.41	0.39	0.27	0.18	0.23	0.13
(16)	12.26	12.09	19.01	17.58	22.93	21.59	17.57	13.25	17.47	17.41	21.69	16.88	12.41	18.21	25.29	20.72	30.31	18.97	9.61	14.78	10.92

(1) Indice de gonflement (Ph. Eur. 6ème ed.2.8.4)- Les valeurs entre parenthèses sont le coefficient de variations relatifs RSD (%) (n=3) / (1) Swelling index (EP 6th ed.2.8.4) - Values in parentheses are relative standard deviations RSD (%) (n=3)

(2) Teneur en mucilage (% en masse sur matière sèche) méthode gravimétrique- Les valeurs entre parenthèses sont: les coefficients de variations relatifs RSD (%) (n=2)

(3) Teneur en Arabinose dans le mucilage issu du tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC, une détermination / (3) Content of Arabinose in linden mucilage (% of dry weight) HPLC method, one determination

(4) Teneur en Rhamnose dans le mucilage issu du tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (4) Content of Rhamnose in linden mucilage (% of dry weight) HPLC method

(5) Teneur en Galactose dans le mucilage issu du tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (5) Content of Galactose in linden mucilage (% of dry weight) HPLC method

(6) Teneur en Glucose dans le mucilage issu du tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (6) Content of Glucose in linden mucilage (% of dry weight) HPLC method

(7) Teneur en hydrates de carbone totaux dans le mucilage issu du tilleul (% en masse sur matière sèche) (somme des hydrates de Carbone: arabinose, rhamnose, galactose, glucose, xylose et mannose)- méthode HPLC

(8) Teneur en Arabinose dans l'inflorescence de tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (8) Content of Arabinose in linden blossom (% of dry weight) HPLC method

(9) Teneur en Rhamnose dans l'inflorescence de tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (9) Content of Rhamnose in linden blossom (% of dry weight) HPLC method

(10) Teneur en Galactose dans l'inflorescence de tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (10) Content of Galactose in linden blossom (% of dry weight) HPLC method

(11) Teneur en Glucose dans l'inflorescence de tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (11) Content of Glucose in linden blossom cell wall (% of dry weight) HPLC method

(12) Teneur en Glucose dans l'inflorescence de tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (12) Content of Glucose in linden blossom cell wall (% of dry weight) HPLC method

(13) Teneur en Xylose dans l'inflorescence de tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (13) Content of Xylose in linden blossom cell wall (% of dry weight) HPLC method

(14) Teneur en Mannose dans l'inflorescence de tilleul (% en masse sur matière sèche)- méthode HPLC / (14) Content of Mannose in linden blossom cell wall (% of dry weight) HPLC method

(15) Teneur en de carbone totaux dans l'inflorescence de tilleul (% en masse sur matière sèche) (somme des hydrates de Carbone: arabinose, rhamnose, galactose, glucose, xylose et mannose)- méthode HPLC

(16) Content of total carbohydrates in linden blossom cell wall (% of dry weight) (sum of carbohydrates as arabinose, rhamnose, galactose, glucose, xylose and mannose) HPLC method

(17) Teneur en Monosaccharide dans le mucilage issu de ces lots de tilleul n'est pas présenté; l'échantillon a été perdu

(18) Monosaccharide composition of mucilage obtained from this linden's batches was not presented because of sample lost

Les extraits aqueux de polysaccharides sont largement utilisés dans le traitement des muqueuses irritées dans la région du pharynx [3; 11]. Les fleurs de tilleul ont fait preuve d'une bioadhésion modérée au tissu épithélial. Cet effet pourrait, au moins en partie, expliquer les effets thérapeutiques du mucilage dans le traitement de la muqueuse buccale irritée. Le mucilage recouvre la muqueuse oropharyngée, apaisant son irritation et soulageant la fatigante toux sèche [3; 11]. Les fleurs de tilleul sont utilisées pour traiter les rhumes avec fièvre, la grippe et d'autres affections associées à des frissons, car l'infusion à base de fleurs de tilleul favorise la transpiration.

Les fleurs de tilleul contiennent des tanins et du mucilage. Ces substances sont très importantes pour le goût de l'infusion à base de fleurs de tilleul. Le goût est important dans la mesure où il faut boire des quantités relativement importantes de tisane pour induire la transpiration. Les fleurs avec une concentration de tanins plus élevée et une teneur en mucilage relativement faible produisent une infusion plus goûteuse que les fleurs avec une concentration de tanins plus faible et une teneur en mucilage relativement élevée. Les fleurs de *Tilia cordata* et de *Tilia platyphyllos* sont les sources de tilleul préférées car elles contiennent une concentration de tanins plus élevée et une concentration de mucilage plus faible que les fleurs des autres espèces. Les infusions préparées à partir de ces deux espèces ont bien meilleur goût [16].

## 2. Caractérisation du mucilage

Les Tiliaceae et leurs cousines Malvaceae sont des substances riches en mucilage. Ces mucilages révèlent la relation entre les Tiliaceae et les Sterculiaceae (mucilage de *Fimbrinaria simplex*) et les Malvaceae (mucilage de *Salvia malabarica*). Les Tiliaceae font partie de l'ordre des Malvales. Dans les fleurs de tilleul, les polysaccharides représentent 3 à 10 % du poids sec [12-13]. D'un point de vue structurel, selon Kram et Franz [9], les polysaccharides du tilleul sont un mucilage acide riche en acides uroniques, environ 50 %, principalement représentés par l'acide galacturique et l'acide glucuronique. Les monosaccharides qui les composent sont principalement le galactose, l'arabinose et le rhamnose et, dans une moindre mesure, le glucose, le mannose et le xylose. L'analyse de la fraction la plus importante (~ 52 % du mucilage total) par RMN 13C révèle la présence de molécules de galactose fixées en 1 3 et 1 6 de la chaîne principale et des molécules d'arabinose dans les ramifications.

therapy for irritated mucous membranes in the pharynx region [3; 11]. Linden blossom showed moderate bioadhesion to epithelial tissue. Such effect suggest that this may account, at least in part, for the therapeutic effects of mucilage in the treatment of irritated buccal membrane. The mucilage covers the oral and throat mucosa soothing irritability, relieving dry and tiresome cough [3; 11]. Linden tree flowers are used to treat feverish colds, flu, and other conditions associated with chilling, because linden flower infusion promotes sweating.

The flowers of the linden tree contain tannin and mucilage. These substances are very important when talking about taste of the linden flower tea. The good taste is important because relatively large amounts of the tea need to be drunk to induce perspiration. Flowers with a higher concentration in tanning and relatively lower concentration in mucilage produce a more tasty infusion than flowers with a lower concentration of tannin and relatively higher concentration in mucilage. Flowers of *Tilia cordata* and *Tilia platyphyllos* are preferred sources of the herb because they contain a concentrated in tannin and a lower concentration of mucilage than flowers of other species. Infusions prepared from these two species taste much better [16].

## 2. Characterization of mucilage.

The Tiliaceae and their cousins the Malvaceae are drugs rich in mucilage. These mucilages reveal the relationship between Tiliaceae and Sterculiaceae (mucilage of *Fimbrinaria simplex*) and malvaceae (mucilage of *Salvia malabarica*). Tiliaceae are part of the order of Malvales. In the linden flowers, polysaccharides represent 3 to 10 % of dry weight [12-13]. From a structural point of view, according to Kram and Franz [9], the polysaccharides of linden are acid mucilage rich in uronic acids, approximately 50%, mainly represented by galacturonic acid and glucuronic acid. The monosaccharides making them up are mainly galactose, arabinose and rhamnose and to a lesser extent glucose, mannose and xylose. The analysis of the largest fraction (~ 52 % of total mucilage) by RMN 13C reveals the presence of molecules of galactose bound in 1 3 and in 1 6 in the main chain and molecules of arabinose in the branchings.

Linden flowers are known to contain considerable quantities of mucilage. Linden flowers contain 3 to

Les fleurs de tilleul sont connues pour contenir des quantités considérables de mucilage. Les fleurs de tilleul contiennent 3 à 20 % de polysaccharides (mucilage) a fraction principale est un arabinogalactane. L'hydrolyse du mucilage, suivie d'une analyse chromatographique, révèle trois monosaccharides dominants : le D-galactose, le L-arabinose et le L-rhamnose, avec différents monosaccharides mineurs : le D-xylose, le D-mannose et le D-glucose [5]. La présence d'acide uronique est aussi mise en évidence. Il s'agit d'acide D-galacturonique et d'acide D-glucuronique.

Le Tableau 1 donne un résumé des sucres contenus dans les fleurs de tilleul. Nos résultats concordent avec la majorité de ce qui a été publié précédemment sur les fleurs de tilleul. Le polysaccharide brut hydrosoluble issu de l'inflorescence de *Tilia* est composé de L-arabinose (1,39 % à 2,98 %), de D-galactose (2,66 % à 9,03 %), de L-rhamnose (1,13 % à 6,70 %) et d'une quantité minime de L-mannose (0,36 % à 0,65 %), de D-glucose (0,75 à 1,55 %) et de D-xylose (0,33 % à 0,54 %).

#### IV - CONCLUSION

Une méthode de détermination gravimétrique du mucilage des fleurs de tilleul a été développée et validée. Il ne semble pas que nous puissions déterminer l'origine ou la nature officinale d'un tilleul en mesurant simplement la concentration de mucilage. Une évaluation semi-quantitative, l'indice de gonflement, qui figure dans la Pharmacopée Européenne pour les substances mucilagineuses, est à peine plus discriminante.

Le mucilage obtenu à partir des fleurs de tilleul est souvent décrit comme un polysaccharide hydrosoluble [3-6-11]. Les résultats de cette étude ainsi que les résultats d'autres études peuvent être utilisés pour sélectionner les espèces souhaitables à des fins médicinales. D'autres méthodes d'évaluation, telles que la détermination de certains polyphénols et, en particulier, celle des précurseurs des anthocyanines, seraient probablement utiles pour différencier les tilleuls en fonction de leurs origines. L'évaluation quantitative des proanthocyanes, qui sont relativement sensibles à l'oxydation, devrait nous permettre de garantir la qualité et la préservation des différents lots de fleurs de tilleul.

20% of polysaccharides (mucilage). The main fraction is an arabinogalactan. Mucilage Hydrolysis followed-up to chromatographic analysis reveals three dominants monosaccharides: D galactose, L-arabinose and L-rhamnose together with different minor monosaccharides: D-xylose, D-mannose and D glucose [5]. The presence of uronic acid is also revealed: this are d-galacturonic acid and d-glucuronic acid.

The table 1 give a summary of the sugar of the linden blossom. Our results are in accordance with the most of previously published for linden blossom. The water soluble crude polysaccharide from *Tilia* inflorescence is composed of L-arabinose (1,39 % to 2,98 %), D-galactose (2,66 % to 9,03 %), L-rhamnose (1,13 % to 6,70 %) and minor amount of L-mannose (0,36 % to 0,65 %), D-glucose (0,75 to 1,55) and D-xylose (0,33 % to 0,54 %).

#### IV - CONCLUSION

A method of gravimetric determination of the mucilage from linden flowers was developed and validated. It would not appear that we can determine the origin or the officinal nature of a linden merely by measuring mucilage concentration. A semi-quantitative assessment: the swelling index that appears in the European Pharmacopea for the mucilaginous drugs, is little more discriminatory.

The mucilage obtained from linden blossom is commonly describe as water-soluble polysaccharide. Although few potential uses of this material have been described [3-6-11]. The results of this study along with the results of other investigations can be used for selection of the desirable species for medicinal applications, control erosion and replace undesirable *tilia* species. Other methods of assessment, such as the determination of some polyphenols, particularly anthocyanin precursors would probably help differentiating lindens origins. The quantitative assessment of proanthocyanes, which are relatively sensitive to oxidation, should enable and preservation of some batches of linden flowers.

Varying quality of the raw material of wild medicinal plants collected from different sites has been reported. On the contrary, cultivation of wild species under controlled conditions ensures standard quality of the raw material.

## RÉFÉRENCES

- [1] European Pharmacopoeia 6th Edition, *Tiliae flos*, Strasbourg, 2007
- [2] Blumenthal M., Busse W.R. Goldberg A. et al. (eds.) The complete German Commission E Monographs: Therapeutic guide to Herbal Medicines, Austin: American Botanical Council and Boston: Integrative Medicine Communications, 1998, 163.
- [3] Gené Puodziunienė, Janulis V., Miliasius A., Budnikas V. Cough-relieving herbal teas, marshmallow root (*Althea radix*), Liquorice root (*Liquiritiae radix*), lime flower (*Tiliae flos*), Iceland moss (*Lichen islandicus*). *Medicina (Kaunas)* 2005, 41(6).
- [4] Bisset N., *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, Stuttgart, Germany, CRC Press, 1996, 496.
- [5] Buchbauer G., Jirovetz L., Jaeger W., Passiflora and lime-blossoms: motility effects after inhalation of the essential oils and some of the main constituents in animal experiment, *Arch. Pharm.*, 1992, 325, 247-248.
- [6] Viola H., Wolfman C., Levi de Stein M., Wasowski C., Pena C., Medina J.H., Paladini A.C., Isolation of pharmacologically active benzodiazepin receptor ligands from *tilia tomentosa* (Tiliaceae) *J. Ethnopharmacol.*, 1994, 44, 47-53.
- [7] Franz G. 1966. die Schleimpolysaccharide von *Althaea officinalis* und *Malva sylvestris*. *Planta Medica*, 14, 89-110.
- [8] Franz G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Medica*, 55, 493-497.
- [9] Kram G., Franz G., 1983. Untersuchungen über die Schleimpolysaccharide aus Lindenblüten. *Planta Medica*, 49, 149-153.
- [10] Kram G., Franz G. 1983. Structural investigations on watersoluble polysaccharides of Lime tree flowers (*Tilia cordata* L.). *Pharmazie*, 40, 501-502.
- [11] Gregory S.K. Larch arabinogalactan: Clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. *Alternative Medicine Review*, 4 (2), 96-, 1999
- [12] (1).Schmidgall, J., Schnetz, E., Hensel, A. (2000) Evidence for bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide-containing herbs in an ex vivo bioadhesion assay on buccal membranes. *Planta Medica* 66: 48-53.
- [13] (2).Gervasoni, L. (1999) La fleur de linden, richesse des Baronniees. Diplôme d'état de docteur en Pharmacie. Université Grenoble.
- [14] (4) Kanschä, H., Lander, C. (1984) How valid is the swelling index as a predictor of quality in the assay procedure of *Tiliae flos*, *German Pharmacopoeia 8 ?*. *Pharm. Ztg* 129(Feb 16): 370-373.
- [15] ISO 11292 (1995) Methods of test for coffee and coffee products. Instant coffee: determination of free and total carbohydrate contents by high performance anion-exchange chromatography.
- [16] Peirce A. the American Pharmaceutical Association's Practicaul guide to natural medicines. Stonesong Press Inc., New York, 1999.
- [17] CLIFORD S.C. et al.  
Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (Rhamnaceae) : localization, composition and physiological roles during drought-stress. *J. of Exp. Botany*, 53, 336, 131-138, 2002.