

## 响应面试验优化日本冷杉针叶精油提取工艺

张辉<sup>1</sup>, 林秀君<sup>1</sup>, 陈莉娟<sup>1</sup>, 刘浩凯<sup>2</sup>, 严邦祥<sup>1</sup>, 赵昌高<sup>1</sup>, 李桥<sup>2</sup>

(1. 景宁畲族自治县生态林业发展中心, 浙江 景宁 323500; 2. 景宁县畲族自治县自然资源和规划局, 浙江 景宁 323500)

**摘要:** 利用响应面(RSM)分析优化日本冷杉 *Abies firma* 针叶精油的提取工艺。以日本冷杉精油得率为考察指标, 在样品粉碎粒度、浸泡时间、蒸馏时间、蒸馏速度 4 个单因素实验基础上, 通过响应面法的 Box-Behnken 实验设计对日本冷杉针叶精油水蒸气蒸馏法提取工艺进行优化, 建立二次多项式回归方程的预测模型。日本冷杉针叶精油的优化提取工艺为: 粉碎粒度 200 目、浸泡时间 37 min、蒸馏时间 108 min、蒸馏速度 2.8 mL·min<sup>-1</sup>。在此优化条件下的精油最大得率为 0.714%, 与预测值 0.716% 具有很好的一致性, 表明采用响应面优化得到的日本冷杉精油提取工艺条件可靠, 可为日本冷杉针叶中精油的提取方法提供参考。

**关键词:** 日本冷杉; 精油; 提取工艺; 响应面试验

中图分类号: S791.149; O658.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776(2023)02-0041-06

## Optimization for Extraction of Essential Oil from Needles of *Abies firma* by Response Surface Methodology

ZHANG Hui<sup>1</sup>, LIN Xiu-jun<sup>1</sup>, CHEN Li-juan<sup>1</sup>, LIU Hao-kai<sup>2</sup>, YAN Bang-xiang<sup>1</sup>, ZHAO Chang-gao<sup>1</sup>, LI Qiao<sup>2</sup>

(1. Ecological Forestry Development Center of She Autonomous County of Zhejiang, Jingning 323500, China

2. Natural Resources and Planning Bureau of She Autonomous County of Zhejiang, Jingning 323500, China)

**Abstract:** In September 2020, needles of introduced 20-year *Abies firma* were collected from Jinning Caoyutang Forest Park, Zhejiang province. Essential oil from needles were prepared by steam distillation with water as solvent, and response surface methodology (RSM) was used to optimize the extraction process. Taking the yield of essential oil as objective, four single factors were tested like particle size, soaking time, distillation time and distillation speed. The extraction process of *A. firma* essential oil by steam distillation was optimized through Box Behnken design of response surface methodology, and a prediction model of quadratic polynomial regression equation was established. The optimal extraction process of the essential oil from *A. firma* needles was as follows: 200 mesh of particle size, 37 minutes of soaking, 108 minutes of distillation, and 2.8 mL/min of the distillation speed. Under this condition, the maximum yield of essential oil was 0.714%, which was in good conformity with the predicted value of 0.716%, indicating that the extraction process was reliable.

**Key words:** *Abies firma*; essential oil; extraction process; response surface methodology (RSM)

冷杉 *Abies fabri* 是松科 Pinaceae 冷杉属 *Abies* 植物, 全球冷杉属植物有 50 余种, 主要分布在北半球温带和寒带<sup>[1]</sup>。目前, 对冷杉的研究主要包括植物类群<sup>[2-5]</sup>、化学成分及其应用<sup>[6-9]</sup>。冷杉属植物的针叶中含有精油, 精油成分主要包含  $\alpha$ -蒎烯、 $\beta$ -蒎烯、 $\delta$ -蒎烯、柠檬烯和  $\delta$ -3-萜烯等单萜和倍半萜类化学成分<sup>[6-11]</sup>, 具有抗菌、除皱、

收稿日期: 2022-10-04; 修回日期: 2023-02-06

基金项目: 景宁畲族自治县科技计划项目(2020A5); 景宁科技计划项目(2022A8)

作者简介: 张辉, 硕士研究生, 林业工程师, 从事森林资源保护培育与开发利用研究; E-mail:taoyuan31@126.com。通信作者: 林秀君, 工程师, 从事林业技术推广、森林资源保护研究; E-mail:jnlxj2021@163.com。

美白等多种生物活性<sup>[12-19]</sup>，作为香精使用可应用于制药、日用化妆品及食品工业中。冷杉精油还可以消除人体紧张情绪而被应用于芳香疗法中<sup>[20]</sup>。因此，提取冷杉精油对开发和利用冷杉资源具有十分重要的意义。

目前，精油的提取方法有水蒸气蒸馏、同时蒸馏萃取、压榨法、超临界流体萃取、亚临界萃取等，其中水蒸气蒸馏方法因其简单易行、无溶剂残留、设备成本低等优点应用范围最广。本研究利用丽水景宁草鱼塘森林公园引种栽培的日本冷杉 *A. firma* 作为研究对象，利用水蒸气蒸馏法提取日本冷杉针叶中的精油，在单因素实验基础上，采用响应面设计方法优化日本冷杉精油提取工艺，为以后日本冷杉针叶精油的综合开发利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

试验材料为日本冷杉老针叶（树龄 20 a），于 2020 年 9 月采集于丽水景宁草鱼塘森林公园。

试剂：二氯甲烷和无水硫酸钠，均为国产分析纯。

仪器与设备：植物精油提取装置 JYJ-10LJ（上海矩源自动化科技有限公司）、电子天平 BSA124S（德国 Sartorius）。

1.2 实验方法

1.2.1 日本冷杉精油的水蒸气蒸馏提取方法 将新鲜采集的日本冷杉针叶用无菌水润洗 3 遍，阴干，粉碎机粉碎，然后将粉碎后的针叶粉置于植物精油提取装置，按 500 : 1 (g·L<sup>-1</sup>) 液料比加入蒸馏水，进行水蒸气蒸馏并收集精油部分，再将收集到的精油部分以无水硫酸钠进行干燥，过滤，二氯甲烷洗涤，收集二氯甲烷部分，自然挥发二氯甲烷，得黄色透明油状物即为日本冷杉针叶精油，保存。精油提取得率 = 精油质量 ÷ 原料质量。

1.2.2 日本冷杉精油提取的单因素试验 采用 1.2.1 精油提取方法，考察不同因素对日本冷杉针叶精油得率的影响，预实验结果发现液料比和萃取溶剂对实验结果影响不明显，因此选择考察粉碎粒度（0、50、100、200、300 目）、浸泡时间（10、20、30、40、50 min）、蒸馏时间（30、60、90、120、150 min）、蒸馏速度（1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL·min<sup>-1</sup>）4 个单因素对日本冷杉针叶精油得率的影响。

1.2.3 Box-Behnken 实验设计（BBD） 根据预试验结果并综合考虑单因素试验结果的影响，采用响应面分析的 BBD 实验设计方法，以日本冷杉针叶精油的得率为实验指标。选取粉碎粒度（A）、浸泡时间（B）、蒸馏时间（C）、蒸馏速度（D）对提取率影响显著的四个因素，分别对应四个独立变量  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ ，在单因素试验的基础上，采用四因素三水平的响应面分析方法（Response surface methodology, RSM），以  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  为自变量，以提取率（Y）为响应值。经多元回归拟合得到日本冷杉针叶精油得率与各因素变量的二次多项式回归方程的预测模型。根据单因素结果，选择相关参数作为最小、最好和最大水平（-1、0、1），并对每个变量进行编码，如表 1 所示。

| 表 1 响应面设计因素及水平                                       |     |       |       |                           |
|--|-----|-------|-------|---------------------------|
| Tab. 1 Factors and levels of response surface design |     |       |       |                           |
| 因素水平   | A/目 | B/min | C/min | D/(mL·min <sup>-1</sup> ) |
| -1   | 0   | 20    | 60    | 2.0                       |
| 0  | 100 | 30    | 90    | 2.5                       |
| 1  | 200 | 40    | 120   | 3.0                       |

2 结果与分析

2.1 日本冷杉针叶精油提取单因素试验

2.1.1 样品粉碎粒度对精油提取效果的影响 样品粉碎粒度对日本冷杉针叶精油提取效果的影响见图 1。由图 1 可知，在浸泡时间 20 min、蒸馏时间 60 min、蒸馏速度 2.0 mL·min<sup>-1</sup> 条件下，随着粉碎粒度的增加，日本冷杉针叶精油得率呈现先增加后趋于下降的趋势。当粉碎粒度>100 目时，精油得率随着粉碎粒度的增加呈现下降趋势，因此选取 100 目作为最适粉碎粒度。

2.1.2 样品浸泡时间对精油提取效果的影响 样品浸泡时间对日本冷杉针叶精油提取效果的影响见图 2。由图 2

可知, 在粉碎粒度 50 目、蒸馏时间 60 min、蒸馏速度  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下, 随着浸泡时间的增加, 日本冷杉针叶精油得率呈现先增加后趋于平缓。当浸泡时间超过 30 min 之后, 精油得率随着浸泡时间的增加趋于平缓并略有下降, 因此选取 30 min 作为最适浸泡时间。

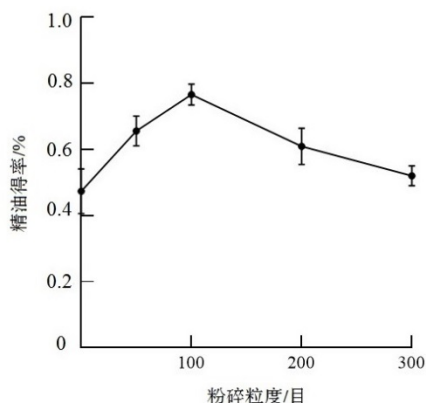


图 1 粉碎粒度对日本冷杉针叶精油提取效果的影响

Fig. 1 Effect of particle size on yield of essential oil

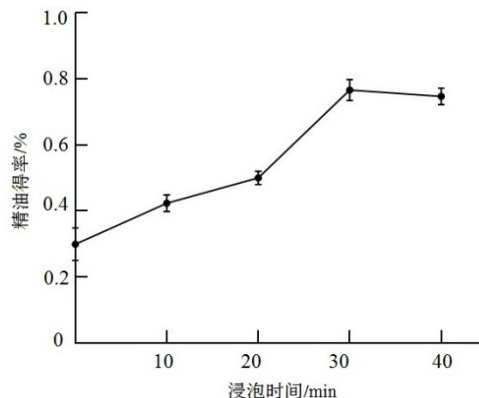


图 2 浸泡时间对日本冷杉针叶精油提取效果的影响

Fig. 2 Effect of soaking time on yield of essential oil

2.1.3 蒸馏时间对精油提取效果的影响 蒸馏时间对日本冷杉针叶精油提取效果的影响见图 3。由图 3 可知, 在浸泡时间 20 min、粉碎粒度 50 目、蒸馏速度  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下, 蒸馏时间对日本冷杉针叶精油得率影响较大, 精油得率在蒸馏初期比较大, 随着蒸馏时间的延长, 精油得率不再提高。其中, 蒸馏时间在 30 ~ 90 min 时, 精油得率提高较快, 当蒸馏时间超过 90 min 之后, 随着蒸馏时间的延长精油得率趋于平缓且略有变化。因此, 综合考虑选择 90 min 作为最适蒸馏提取时间。

2.1.4 蒸馏速度对精油提取效果的影响 蒸馏速度对日本冷杉针叶精油提取效果的影响见图 4。由图 4 可知, 在浸泡时间 20 min、粉碎粒度 50 目、蒸馏时间 60 min 条件下, 通过调节精油提取装置加热功率输出大小改变蒸馏速度, 发现蒸馏速度对日本冷杉针叶精油得率影响波动幅度较小, 随着蒸馏速度的增加, 精油得率平缓上升, 当蒸馏速度大于  $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 便不再提高且呈现下降趋势。因此, 综合考虑选择  $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  作为最适蒸馏速度。

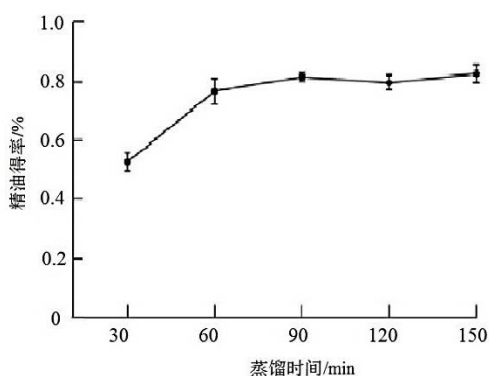


图 3. 蒸馏时间对日本冷杉针叶精油提取效果的影响

Fig. 3 Effect of distillation time on yield of essential oil

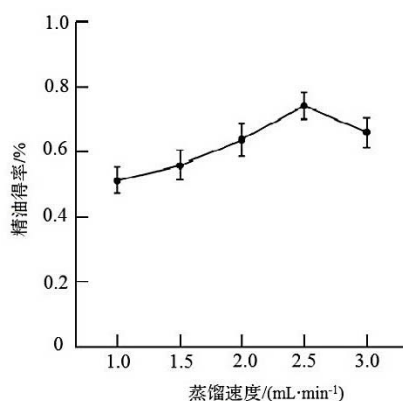


图 4 蒸馏速度对日本冷杉针叶精油提取效果的影响

Fig. 4 Effect of distillation speed on yield of essential oil

## 2.2 响应面优化日本冷杉针叶精油提取工艺实验设计与结果

2.2.1 Box-Behnken 试验设计方案及结果 以日本冷杉针叶精油提取得率为响应值, 选用中心符合模型, 做四因素三水平共 29 个实验点 (5 个中心点, 24 个析因点) 响应面分析实验, 设计组合及结果见表 2。

2.2.2 回归模型的建立 根据响应面分析试验, 对粉碎粒度 (A)、浸泡时间 (B)、蒸馏时间 (C)、蒸馏速

度 (D) 分别进行如下变化:  $X_1=(A-100)\times 100^{-1}$ ,  $X_2=(B-10)\times 10^{-1}$ ,  $X_3=(C-90)\times 30^{-1}$ ,  $X_4=(D-2.5)\times 0.5^{-1}$ , 转换后以粉碎粒度 ( $X_1$ )、浸泡时间 ( $X_2$ )、蒸馏时间 ( $X_3$ )、蒸馏速度 ( $X_4$ ) 为自变量, 精油得率 ( $Y$ ) 为因变量, 采用 Design expert 8.0 软件对所得数据进行分析, 结果如表 2 所示, 各因素经回归拟合后, 得到日本冷杉针叶精油提取得率  $Y$  与  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  的二次多项回归方程为:

$$Y = -3.804 + 1.415 \times 10^{-3}X_1 + 0.032\,283X_2 + 0.016\,678X_3 + 2.61X_4 + 7.5 \times 10^{-6}X_1X_2 + 4.166\,67 \times 10^{-6}X_1X_3 - 5 \times 10^{-5}X_1X_4 + 8.333\,33 \times 10^{-5}X_2X_3 + 0.01X_2X_4 - 1.666\,67 \times 10^{-4}X_3X_4 - 8.575 \times 10^{-6}X_1^2 - 1.082\,5 \times 10^{-3}X_2^2 - 1.077\,78 \times 10^{-4}X_3^2 - 0.568X_4^2$$

方差分析结果见表 3。

表 2 响应面设计方案及结果  
Tab. 2 Results of response surface design

| 序号 | A  | B  | C  | D  | 精油得率/% | 序号 | A  | B  | C  | D  | 精油得率/% |
|----|----|----|----|----|--------|----|----|----|----|----|--------|
| 1  | 0  | -1 | -1 | 0  | 0.64   | 16 | 0  | 1  | 0  | -1 | 0.55   |
| 2  | -1 | 1  | 0  | 0  | 0.62   | 17 | 0  | 1  | 1  | 0  | 0.63   |
| 3  | 1  | -1 | 0  | 0  | 0.63   | 18 | 0  | -1 | 0  | -1 | 0.61   |
| 4  | 0  | -1 | 0  | 1  | 0.57   | 19 | -1 | 0  | 0  | -1 | 0.58   |
| 5  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0.64   | 20 | 0  | 1  | -1 | 0  | 0.59   |
| 6  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0.85   | 21 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0.81   |
| 7  | 1  | 0  | 0  | -1 | 0.56   | 22 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0.86   |
| 8  | -1 | 0  | -1 | 0  | 0.63   | 23 | -1 | 0  | 0  | 1  | 0.62   |
| 9  | 0  | 1  | 0  | 1  | 0.71   | 24 | 1  | 0  | -1 | 0  | 0.73   |
| 10 | -1 | -1 | 0  | 0  | 0.64   | 25 | 1  | 0  | 1  | 0  | 0.75   |
| 11 | 0  | 0  | -1 | 1  | 0.63   | 26 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0.83   |
| 12 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0.82   | 27 | 0  | 0  | 1  | 1  | 0.60   |
| 13 | 0  | 0  | 1  | -1 | 0.55   | 28 | 1  | 0  | 0  | 1  | 0.59   |
| 14 | -1 | 0  | 1  | 0  | 0.60   | 29 | 0  | -1 | 1  | 0  | 0.58   |
| 15 | 0  | 0  | -1 | -1 | 0.57   |    |    |    |    |    |        |

表 3 BBD 模型的方差分析  
Tab. 3 ANOVA on Box-behnken design model

| 方差来源           | 平方和                    | 自由度 | 均方                     | F      | P        |
|----------------|------------------------|-----|------------------------|--------|----------|
| 模型             | 0.230                  | 14  | 0.017                  | 9.390  | <0.000 1 |
| A              | 3.675×10 <sup>-3</sup> | 1   | 3.675×10 <sup>-3</sup> | 2.070  | 0.172 4  |
| B              | 4.083×10 <sup>-4</sup> | 1   | 4.083×10 <sup>-4</sup> | 0.230  | 0.639 1  |
| C              | 5.333×10 <sup>-4</sup> | 1   | 5.333×10 <sup>-4</sup> | 0.300  | 0.592 4  |
| D              | 7.500×10 <sup>-3</sup> | 1   | 7.500×10 <sup>-3</sup> | 4.220  | 0.059 1  |
| AB             | 2.250×10 <sup>-4</sup> | 1   | 2.250×10 <sup>-4</sup> | 0.130  | 0.727 3  |
| AC             | 6.250×10 <sup>-4</sup> | 1   | 6.250×10 <sup>-4</sup> | 0.350  | 0.562 6  |
| AD             | 2.500×10 <sup>-5</sup> | 1   | 2.500×10 <sup>-5</sup> | 0.014  | 0.907 3  |
| BC             | 2.500×10 <sup>-3</sup> | 1   | 2.500×10 <sup>-3</sup> | 1.410  | 0.255 3  |
| BD             | 0.010                  | 1   | 0.010                  | 5.630  | 0.032 6  |
| CD             | 2.500×10 <sup>-5</sup> | 1   | 2.50×10 <sup>-5</sup>  | 0.014  | 0.907 3  |
| A <sup>2</sup> | 0.048                  | 1   | 0.048                  | 26.840 | 0.000 1  |
| B <sup>2</sup> | 0.076                  | 1   | 0.076                  | 42.770 | <0.000 1 |
| C <sup>2</sup> | 0.061                  | 1   | 0.061                  | 34.340 | <0.000 1 |
| D <sup>2</sup> | 0.130                  | 1   | 0.130                  | 73.600 | <0.000 1 |
| 残差             | 0.025                  | 14  | 1.777×10 <sup>-3</sup> |        |          |
| 失拟项            | 0.023                  | 10  | 2.316×10 <sup>-3</sup> | 5.390  | 0.059 5  |
| 误差项            | 1.720×10 <sup>-3</sup> | 4   | 4.300×10 <sup>-4</sup> |        |          |
| 总和             | 0.260                  | 28  |                        |        |          |

由表 3 可知, 回归模型  $P<0.000\,1$ , 表明模型具有显著性, 可用于响应值预测, 失拟项  $P=0.059\,5>0.05$ , 无显著性, 表明该方程对试验结果拟合情况好、误差小。因此可用该回归方程对试验结果进行分析和预测, 得

到精油得率的预测值为 0.716%。

2.2.3 响应面交互作用分析与优化 RSM 方法的图形是特定的响应面 ( $Y$ ) 与对应的因素  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  构成的一个三维空间在二维平面的等高图。用 Design-Expert 软件对表 2 数据进行四元二次回归拟合, 所得回归方程的响应面等高线曲面图 (图 5)。比较图 5 中 6 个等高线曲面图可知: 粉碎粒度 (A) 对精油得率的影响较为显著, 表现为曲线相对较陡; 其次为浸泡时间 (B)、蒸馏时间 (C)、蒸馏速度 (D), 均表现为曲线较为平滑, 随其数值的增加或减少, 响应值变化较小。

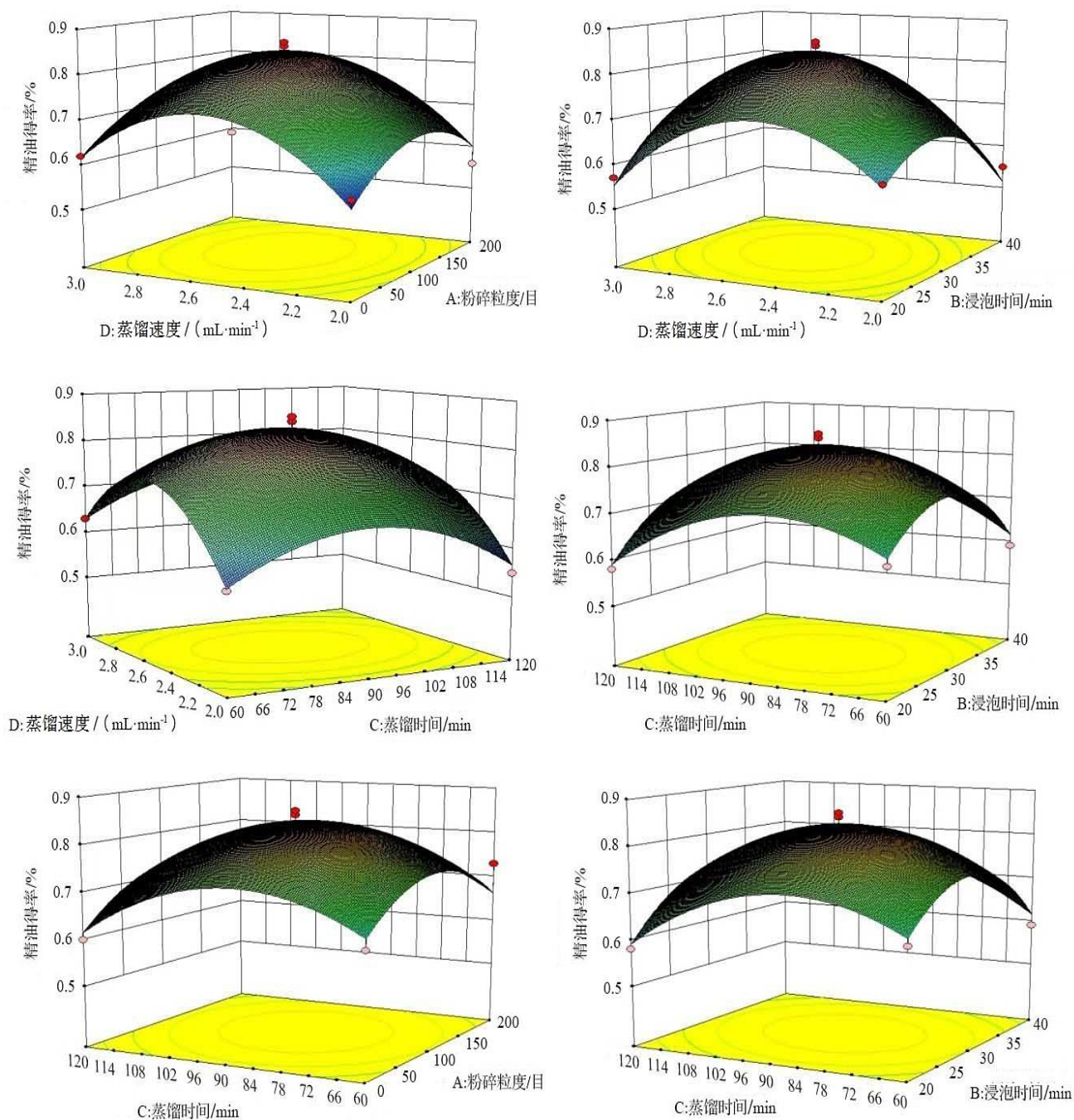


图 5 日本冷杉精油提取的综合评分等高线曲面图

Fig. 5 Contour curve of comprehensive score of essential oil yield from *A. firma*

由各响应面立体图中可以看出, 响应值存在最大值。通过 Design-Expert 软件计算得出日本冷杉针叶精油的

最佳提取工艺为：粉碎粒度 172.99 目、浸泡时间 37.07 min，蒸馏时间 108.7 min，蒸馏速度 2.79 mL·min<sup>-1</sup>。考虑到实际可操作性，最终将其调整为：粉碎粒度 200 目、浸泡时间 37 min、蒸馏时间 108 min、蒸馏速度 2.8 mL·min<sup>-1</sup>。

2.2.4 优化工艺的验证 根据优化出的最佳条件，进行 3 次验证试验，结果见表 4。由表可知，综合得率平均值为 0.714%，与预测值 0.716% 基本吻合，表明此方法重现性好，工艺稳定。

| 表 4 优化提取工艺验证  |        |       |       |
|---|--------|-------|-------|
| Tab.4 Verification experiment of optimal extraction process |        |       |       |
| 编号  | 精油得率/% | 平均值/% | RSD/% |
| 1   | 0.717  | 0.714 | 0.505 |
| 2   | 0.710  |       |       |
| 3   | 0.715  |       |       |

### 3 结论

对日本冷杉针叶精油提取的粉碎粒度、浸泡时间、蒸馏时间、蒸馏速度 4 个单因素试验结果表明，日本冷杉针叶最适粉碎粒度 100 目，最适浸泡时间为 30 min，最适蒸馏提取时间为 90 min，最适蒸馏速度为 2.5 mL·min<sup>-1</sup>。本研究采用 Design-Expert 软件的 BBD 模式，建立日本冷杉针叶精油的四元二次回归方程，经检验该回归方程合理可靠，能较好地预测日本冷杉针叶精油的提取量。对日本冷杉针叶精油的提取工艺进行了优化，结合响应面交互作用分析结果和实际情况进行预测，并经验证得出日本冷杉针叶精油的优化提取工艺：粉碎粒度为 200 目，浸泡时间为 37 min，蒸馏时间为 108 min，蒸馏速度为 2.8 mL·min<sup>-1</sup>。在此条件下精油得率为 0.714%，与预测值 0.716% 基本吻合，说明采用响应面优化得到的日本冷杉精油提取工艺条件可靠，可为日本冷杉针叶中精油的提取方法提供参考依据。

### 参考文献：

[1] FARJON A, RUSHFORTH K D. A classification of *Abies* Miller (Pinaceae)[J]. Miscellan Publ Univ Utrecht Herbar, 1989, 46 ( 1 ) : 59 – 79.

[2] 邵彬, 邓坤枚. 长白山北坡亚高山云冷杉林的植物种类组成及重要值[J]. 自然资源学报, 2000, 15 ( 1 ) : 66 – 73.

[3] 庄平. 峨眉山冷杉种群研究[J]. 广西植物, 2002, 22 ( 1 ) : 40 – 44.

[4] 史小华. 秦岭冷杉与巴山冷杉种群动态比较研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2007.

[5] 史小华, 刘毅, 彭佳龙, 等. 秦岭冷杉和巴山冷杉种群年龄结构及动态的比较分析[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37 ( 1 ) : 10 – 14.

[6] 赵倩倩, 肖琴, 苗宇, 等. 秦岭冷杉茎叶的化学成分研究[J]. 中草药, 2020, 51 ( 06 ) : 1491 – 1497.

[7] 王国伟. 岷江冷杉的化学成分与体外抗肿瘤活性研究[D]. 上海交通大学, 2015.

[8] 陈旭. 巴山冷杉化学成分及生物活性研究[D]. 华中科技大学, 2013.

[9] 常博, 肖琳婧, 张健, 等. 云南黄果冷杉的化学成分[J]. 中国药科大学学报, 2014, 45 ( 01 ) : 43 – 47.

[10] 王威, 赵志兰, 牛志多, 等. 毛细管气相色谱法测定臭冷杉挥发油中柠檬烯含量[J]. 中草药, 2003, 34 ( 7 ) : 605 – 606.

[11] 段云博, 朱晓珍, 胡兴华, 等. 资源冷杉与元宝山冷杉针叶精油成分的比较[J]. 广西植物, 2020, 40 ( 5 ) : 67 – 76.

[12] KIM K, BU Y, JEONG S, et al. Memory-enhancing effect of a supercritical carbon dioxide fluid extract of the needles of *Abies koreana* on scopolamine-induced amnesia in mice[J]. Bioscie Biotechnol Biochem, 2006, 70 ( 8 ) : 1821 – 1826.

[13] JEONG S I, LIM J P, JEON H. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oil from *Abies koreana*[J]. Phytother Res, 2007, 21 ( 12 ) : 1246 – 1250.

[14] RAMDANI M, LOGRADA T, CHALARD P, et al. Chemical and antimicrobial properties of essential oils from three coniferous trees *Abies koreana*, *Cryptomeria japonica*, and *Torreya nucifera*[J]. J App Biol Chem, 2007, 50 ( 3 ) : 164 – 169.

[15] LEE J H, HONG S K. Comparative analysis of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from *Abies holophylla* and *Abies koreana*[J]. Microbiol Biotechnol, 2009, 19 ( 4 ) : 372 – 377.

[16] DALL'ACQUA S, MINESSO P, SHRESTA B B, et al. Phytochemical and antioxidant-related investigations on bark of *Abies spectabilis* (D. Don) Spach. from Nepal[J]. Molecules, 2012, 17 ( 2 ) : 1686 – 1697.

[17] POLYAKOV N A, DUBINSKAYA V A, EFREMOV A A, et al. Biological activity of *Abies sibirica* essential oil and its major constituents for several enzymes in vitro [J]. Pharmac Chem J, 2014, 48 ( 7 ) : 456 – 460.

[18] PICHETTE A, LAROUCHE P L, LEBURN M, et al. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil[J]. Phytother Res, 2006, 20 ( 5 ) : 371 – 373.

[19] SONG B W, SONG M J, PARK M J, et al. Anti-wrinkle and whitening effects of disentang oil from *Abies koreana*[J]. J Life Sci, 2018, 28 ( 5 ) : 524 – 531.

[20] SEO M, SOWNDHARARAJAN K, KIM S. Influence of binasal and uninasal inhalations of essential oil of *Abies koreana* twigs on electroencephalographic activity of human[J]. BehavNeurol, 2016: 1 – 11.