

홍화(*Carthamus tinctorius* L.)씨의 sterol 및 phytoestrogen 분석

최영주* · 최상욱

신라대학교 식품영양학과 & 마린바이오산업화지원센터, 경상대학교 공동실험실습관

Sterol Composition and Phytoestrogen Activity of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed

Young Ju Choi* and Sang Wook Choi

Department of Food and Nutrition & Marine-Biotechnology Center for Bio-Functional Material Industries,
Silla University, Busan 617-736, Korea
Central Laboratory, Gyeongsang Natl. University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

This study was done to investigate the phytosterol compositions of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. The phytoestrogen activity was also determined using CAT-ELISA Kit in ethanol extract of safflower seed. The phytosterol of safflower seeds was identified using gas chromatography-mass spectrometry after saponification of the oils. The phytosterol content and composition of safflower seed oils were 4% and identified stigmast-5-en-3-ol (3β , 24S)-form, γ -sitosterol (clionasterol) with Wiley MS spectrum library. The synergistic effect of human estrogen receptor (hER) has been investigated using a minimal chimeric promoters composed of the TATA region of the adenovirus-2 major late promoter (A22MLP) and two consensus perfectly polindromic *Xenopus* vitellogenin A2 gene estrogen responsive elements (XVERE119). Transient transfection experiments in the human breast adenocarcinoma cell line MCF-7, which is known to express the estrogen receptor endogenously, revealed that phytoestrogen from *Carthamus tinctorius* L. acts as estrogen. We have observed the transcriptional activities stimulated methanol and ethanol extract of safflower seed in MCF-7, were 0.43 and 0.37 respectively, compared to that by β -estradiol as 1.0. Our data showed that safflower seeds have estrogenic activity methanol and ethanol extracts and ethanol lower than that of β -estradiol. This result provides the first evidence that the beneficial effect of safflower seeds may be mediated, at least in part, by the stimulating effect of phytoestrogen on bone-protecting.

Key words – bone-protecting, phytoestrogen, phytosterol, safflower

서 론

Phytosterol은 식물유지의 불검화물 중에서 가장 중요한

화합물이다. Phytosterol 에는 β -sitosterol, campesterol, stigmasterol 및 brassicasterol 있으며 그중 가장 풍부한 것은 β -sitosterol이다[6]. 이러한 식물성 sterol은 혈중콜레스테롤 저하작용 등 중요한 생리적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

Phytoestrogen은 에스트로겐과 구조가 비슷하면서 부작

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 82-51-309-5459, Fax : 82-51-309-5687

E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

용도 거의 없다. 이러한 phytoestrogen은 많은 부작용을 초래하는 합성 estrogen 대체물질로서 많은 연구가 진행되고 있다[23].

최근 식생활의 변화는 순환기계질환, 암, 뇌졸중 등 성인병의 증가를 초래하게 되었으며, 이러한 성인병의 치료에 약물이거나 의료적인 치료보다는 식생활의 조절에 의한 예방의학에 대한 관심이 높아지면서 최근 식품분야에서 생체조절기능을 가지는 기능성 식품 및 건강보조식품의 개발이 급속히 증가하고 있는 실정이다. 국내에서는 오래 전부터 민간요법으로 약용식물을 이용한 치료법이 발전되어 왔으며 동의보감과 같은 의서에는 경험론적으로 약용식물에 대한 효능 등이 기록되어 있어 이러한 작물들을 중심으로 생화학 및 분자생물학적 연구가 활발히 진행되고 있다.

홍화(safflower)는 잇꽃이라고 하는 국화과(Compositae)에 속하는 일년생 초목으로 원산지는 아프카니스탄의 산악지대 또는 에디오피아, 중국, 티벳 등지에서 재배되기도 한다. 홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서 약용목적으로 주로 재배되고 있으며, 근래에 와서는 미국, 인도 등지에서 식용유 생산용으로 재배되고 있다. 홍화의 꽃과 씨는 모두 약용으로 사용되는데 꽃의 약용성분인 carthamin(C₂₁H₂₂O₁₁)은 약성이 따뜻하고 피를 다스린다하여 어혈, 통경약으로 한방에 널리 사용되어 왔다[5,10,11]. 또한 꽃잎에서 추출한 색소는 식품 및 화장품의 착색료로 사용되고 있으며 종실에는 지방이 다량(15~37%) 함유되어 있다. 특히 필수지방산인 linoleic acid은 혈중 cholesterol 수치를 저하시켜 동맥경화증의 예방과 치료에 효과가 있으며, 고혈압, 협심증, 고지혈증[1,2,7]에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

홍화의 꽃과 씨에는 탁월한 생체조절기능이 알려져 있으나 그 작용기작은 일부를 제외하고 거의 밝혀져 있지 않다. 홍화에 대한 연구는 주로 홍화의 항산화 작용[9,16,20,24], 이화학적 특성[14] 및 홍화씨 식이가 지질대사에 미치는 영향 등[14,16]에 관해서 주로 연구되었다. 홍화의 또 다른 중요한 기능중의 하나가 각종 뼈 질환, 특히 골다공증, 퇴행성관절염, 골수염 환자 및 노약자들에게 좋다는 사실이 알려지면서 뼈 질환의 치료 및 예방을 위한 한약제로도 널리 이용되고 있다[8,12,21].

본 연구에서는 그 동안 경험적이고 비과학적 차원에서 활용되고 있던 자생식물의 활용수준에서 벗어나, 생명공학 기술을 접목시켜 보다 과학적이고 고부가가치의 신 기능

성 식품소재를 개발하기 위해서 홍화씨의 sterol 분석 및 estrogen 효능을 분석하고 이를 이용한 건강보조식품의 재료로 활용하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 홍화씨는 경남 함양지역에서 재배한 것으로 홍화씨를 동결 건조한 후 homogenizer를 사용하여 20 mesh로 마쇄하여 분석시료로 사용하였다.

지질추출 및 TLC 분획

홍화씨로부터 총 지질은 Folch 등의[4] 방법으로 추출하였다. 분리된 지질에 1 N-KOH (EtOH)를 가하여 90°C waterbath 상에서 1시간 환류시킨 후, 불검화물을 분리하였다. 분리된 불검화물은 thin layer chromatography (TLC) plate (Kieselgel 60G, Merck, 20×20 cm)에 loading한 후 전개용매(n-hexane : diethyl ether = 7:3, v/v)로 전개시켜 건조한 다음 Rhodamin-6G로 발색하여 UV lamp 하에서 관찰하고 분리하였다.

Sterol 분석

TLC에 의해 분리된 분획물은 Gas Chromatography-MASS Spectrometer (GC/MS JMS-700, Jeol, Japan), DB-5capillary column (0.32 μm×60 m, 0.25 μm)으로 분석하였다. 얻어진 spectrum은 Wiley MS spectrum library를 사용하여 동정하였다. GC/MS 분석조건은 ionizing energy (70 eV), ionizing current (300 μA), chamber temp (250°C) 및 ionizing mode (EI mode)를 사용하여 분석하였다.

홍화씨의 ethanol 추출

홍화씨 200 g에 ethanol 1500 ml를 가하여 70°C에서 5시간 2회 반복 추출한 후 glass filter로 여과하였다. 여액은 evaporator로 감압 농축하여 phytoestrogen 활성측정을 위한 시료로 사용하였다

Phytoestrogen 분석을 위한 세포주 배양

MCF7/pDS-CAT-ERE119-Ad2MLP 세포주는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) w/o phenol red (Bio

Whittaker, USA), 10% charcoal stripped fetal bovine serum (FBS, Life Technologies, USA) 배지를 이용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포주는 일주일에 2~3회 정도 새로운 배지로 교환하였고, 배양된 세포주는 배지를 제거하여 phosphate buffered saline (PBS, Bio Whittaker, USA)로 2번 세척하고 Trypsin-Versene (EDTA) mixture (Bio Whittaker, USA) 처리하여 5 분 배양 후, DMEM w/o phenol red, 10% charcoal stripped FBS 배지로 세포주를 골고루 분산되도록 희석하여 5 ml의 배지에서 계대 배양하였다.

Phytoestrogen 분석을 위한 시료처리

MCF7/pDS-CAT-ERE119-Ad2MLP 세포주는 DMEM w/o Phenol red, 10% charcoal stripped FBS 배지 5 ml에 37°C 5% CO₂ incubator에서 2-3 일간 배양한 후 각 시료 당 각각 3 개의 dishes에 5 µl 씩 처리하여 48 시간 배양하고 세포를 회수하여 반응성을 측정하였다. 홍화씨 추출물의 최종농도는 500 mg/ml, 50 mg/ml 및 5 mg/ml를 사용하였으며 표준물질로 이용된 17β-estradiol은 에탄올에 녹여 최종농도를 (10⁻⁸~10⁻¹⁰ M)로 조절하여 사용하였다.

CAT(Chloramphenicol Acetyltransferase) 활성 측정

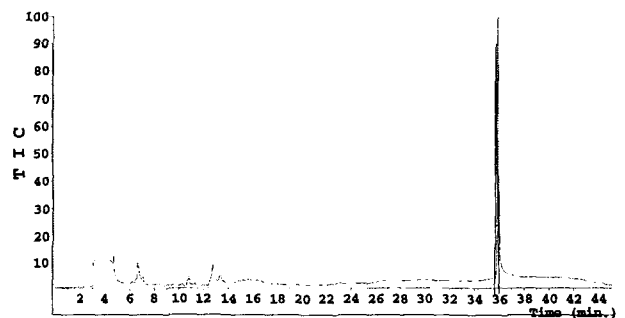
Phytoestrogen 활성측정은 Chambon 등[17]의 방법에 따라 수행하였다. 홍화씨 추출물을 첨가하여 48 시간 배양한 MCF7/pDS-CAT-ERE119- Ad2MLP 세포는 배지를 제거하고 PBS 2 ml로 2번 세척한 후 PBS 1 ml를 첨가하여 집균하였다. 집균한 세포를 1.5 ml centrifuge tube에 옮겨 6,000 rpm에서 2분 동안 원심분리 하여 상등액을 제거하고 TEN buffer [40 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA] 1 ml를 첨가하여 혼합 세정하고 원심분리 한 후, 상등액을 제거하였다 (2회 반복). 여기에 250 mM Tris-buffer를 250 µl 첨가하여 -20°C에서 5분, 37°C에서 5 분 동안 처리하는 방법을 4 회 반복하여 세포를 lysis 한 다음 14,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하여 상등액 중 200 µl를 취하여 CAT 활성을 측정하였다. CAT 활성은 CAT-ELISA Kit (Boehringer Mannheim, USA)를 사용하여 manual에 따라 수행하였다. MTP-modules에 각각의 cell extract를 200 µl /well 넣고 37°C 배양기에서 1시간 배양한 후 washing

buffer 250 µl로 각각 30 초간 5 회 반복 세척하였다. 여기에 anti-CAT-DIG working solution 200 µl를 첨가하여 37 °C 배양기에서 1 시간동안 배양한 후 다시 washing buffer 250 µl로 각각 30 초간 5회 반복 세척하였다. 여기에 anti-CAT-POD working solution 200 µl를 첨가하여 37°C 배양기에서 1시간 동안 배양한 후, 다시 washing buffer 250µl로 각각 30 초간 5 회 반복 세척하였다. 여기에 POD-substrate 200 µl를 첨가하여 green color로 변할 때까지 37 °C 배양기에 배양한 후 microplate reader (Molecular Dynamics, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. CAT 활성은 해당 세포 추출액의 단백질량으로 정량하였다.

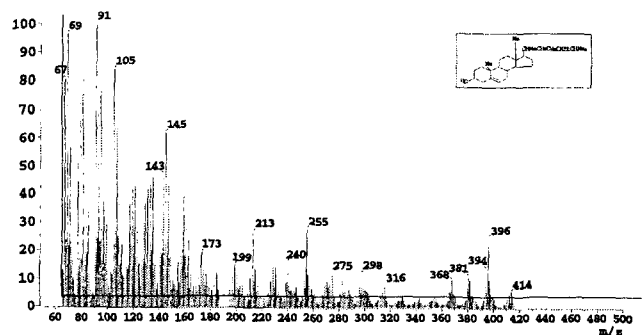
결 과

홍화씨의 phytosterol 분석

홍화씨의 sterol 분석은 GC-MS와 Wiley MS spectrum library를 사용하여 분석하였다 (Fig. 1). 홍화씨에 존재하



(A)



(B)

Fig. 1. Gas chromatogram of the total ion count (TIC) of safflower seed oil unsaponifiabiles (A), Mass spectrum of γ-sitosterol (clionasterol) (B).

는 식물성 sterol은 stigmast-5-en-3-ol (3β , 24S)-form인 γ -sitosterol (clionasterol)로 확인되었으며 홍화에 존재하는 식물성 sterol의 함량은 총 지질의 약 4%를 함유하였다. 홍화씨에 존재하는 중요한 4-desmethyl sterols 에는 sitosterol만이 확인되었다. 홍화의 지질에 대한 연구는 주로 지방산 조성 분석[14]이나 홍화씨 분말을 급여한 쥐의 지질대사 및 골 대사에 미치는 영향 등[8,12,21]에 대한 많은 연구는 있으나, 홍화씨의 sterol 분석에 대한 보고는 거의 없다. 식물성 sterol은 cholesterol처럼 식물 세포막의 구성성분으로써 화학적인 구조도 cholesterol과 유사하며 체내에서 cholesterol의 흡수를 저하시키는 것으로 밝혀져 있다[13,16]. 대표적인 식물성 sterol은 베타-시토스테롤(β -sitosterol), 베타-시토스타놀(β -sitostanol), 캠페스테롤(campesterol) 및 스티그마스테롤(stigmasterol) 등이 있으며 식물성 스테롤 중에서 sitostanol이 가장 콜레스테롤 흡수 억제 효과가 높은 것[6]으로 보고되고 있다.

홍화씨의 estrogen 유사효과 검증

홍화씨의 식물성 sterol의 분석은 estrogen 수용체 promoter와 CAT reporter 유전자를 이용하여 분석하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 홍화씨의 식물성 estrogen 효과는 β -estradiol (10^{-8} M)의 활성을 1로 했을 때 홍화씨의 에탄올 층(5 mg/ml) 및 메탄올 층(5 mg/ml)에서 각각 0.37과 0.43으로 estrogen 유사효과를 나타내었다(ANOVA $p < 0.001$). 홍화씨의 phytoestrogen 활성은 석류 등에 비하면 낮은 estrogen 유사효과를 나타내고 있기 때문에 홍화씨가 각종 뼈 질환, 특히 골다공증, 퇴행성관절염, 골수염 환자 및 노약자들에게 좋은 효과를 나타내는 것은 홍화씨의 다른 중요한 성분이 작용하는 것으로 생각된다. 사람이 섭취하는 식품 중에 이러한 phytoestrogen이 많이 들어있는 작물로서는 isoflavone류의 genistein이나 daizein이 많이 함유되어 있는 대두와 phytoestrogen이 많이 함유되어 있는 석류 등[22]이 있다.

고 찰

홍화씨에 포함된 estrogen에 의한 전사활성 촉진은 MCF7/pDS-CAT-ERE119-Ad2MLP system을 사용하여 estrogen 수용체와 reporter gene 발현을 이용하는 방법으로 세포에

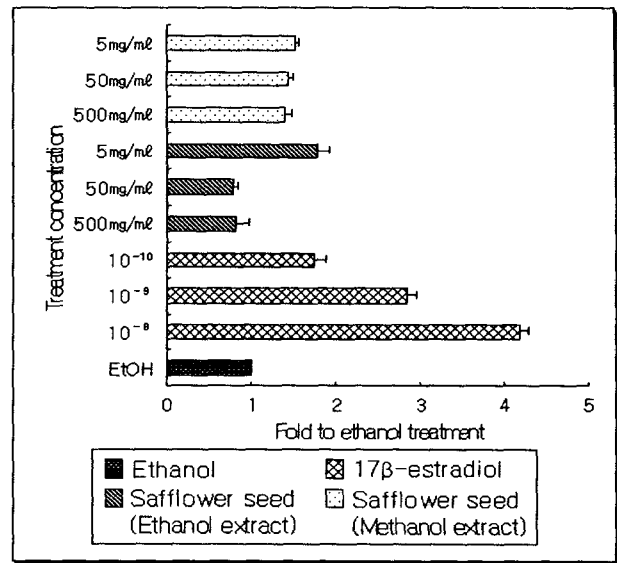


Fig. 2. Transcriptional activity of XVERE119-Ad2MLP gene promoter in response to β -estradiol, methanol and ethanol extracts of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. MCF7, human breast cancer cell line. Significant (ANOVA <0.001)

직접 처리함으로써 중요한 생물학적 효과를 측정할 수 있다. 또한 수용체에 대한 친화성이 독성을 나타낸다는 점에서 항체를 이용한 방법의 문제점을 극복하고 수용체와 estrogen 복합체에 의한 reporter gene의 발현정도를 쉽게 측정할 수 있다. 최근 이 시스템을 이용하여 phytoestrogen 효능 분석, agonist와 antagonist의 구별 및 대규모 screening이 가능하게 되었다.

홍화씨의 다양한 효능 중의 하나가 뼈 질환 및 골다공증 예방에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 대부분의 연구자들은 홍화씨 분말을 식이한 흰쥐에서의 골 밀도 [8,12,21] 및 신생골 형성[19]등을 조사한 것으로 홍화씨가 골 밀도 및 형성에 효능이 있는 것으로 확인되고 있다. 그런데 본 연구에서는 홍화씨의 phytoestrogen 활성을 측정한 것으로 홍화씨의 phytoestrogen이 뼈 질환 및 골다공증 치료에 직접 영향을 주는가를 연구한 것은 대단히 중요하다. 뼈는 세포와 이들 세포간에 존재하는 다량의 골 기질로 이루어져 있으며 골 기질은 collagen으로 구성된 유기질과 칼슘과 인산으로 구성된 hydroxyapatite로 이루어진 무기 성분으로 이루어져 있다. 뼈 발생 및 성장, 형성된 뼈의 유지는 부갑상선 호르몬 (parathyroid hormone), calcitonin

및 estrogen이 중요한 작용을 하며 비타민 D도 뼈 형성[18]에 중요한 기능을 한다. 만약에 홍화의 뼈 질환에 대한 효능이 phytoestrogen에 의한 작용이라면 식물성 estrogen 중 phytoestrogen 효능이 높은 석류 등을 섭취하는 것이 더욱 효과적일 수 있는데 석류를 뼈 질환 치료 등에 사용하는 보고는 거의 없으며, 석류의 phytoestrogen 효능에 대한 연구는 많이 수행되었다[3,15]. 또한 대두에도 이러한 식물성 estrogen이 많이 들어 있는 것으로 알려져 있지만 뼈 치료 등에 대두를 섭취하는 경우는 거의 없으며, 이러한 결과는 홍화씨의 뼈 질환에서의 효과는 식물성 estrogen에 의한 효능보다는 다른 성분에 의한 작용인 것으로 추론된다. 특히 홍화에 존재하는 백금이 뼈 질환 치료에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있지만 더욱 연구가 수행되어야 하겠다.

요 약

홍화씨가 골절, 골다공증 및 골형성부전증 등의 골 질환 치료에 효과가 있다는 것이 알려져 민간요법으로 사용되고 있으나 홍화씨의 어떤 성분이 이러한 작용을 하는지에 관해서는 거의 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 홍화씨의 sterol 조성을 분석하고 폐경기 여성들의 골다공증 치료에 사용되고 있는 합성 estrogen 대체물질로써 그 기능이 확인된 phytoestrogen 활성을 측정하였다. Cholesterol에서 성호르몬인 estrogen이 합성되는 것처럼 식물 sterol 도 phytoestrogen 합성을 위한 전구체 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 홍화씨에 존재하는 식물성 sterol은 stigmast-5-en-3-ol (3 β , 24S)-form인 γ -sitosterol (clionasterol)로 확인되었으며 홍화에 존재하는 식물성 sterol의 함량은 총 지질의 약 4%를 함유하였다. 홍화씨의 sterol 분석은 GC-MS와 Wiley MS spectrum library를 사용하여 분석하였으며 홍화씨에 존재하는 중요한 4-desmethyl sterols 에는 sitosterol 만이 확인되었다. 홍화씨의 식물성 estrogen 효과는 β -estradiol (10^{-8} M)의 활성을 1로 했을 때 홍화씨의 에탄올 층(5 mg/ml) 및 메탄올 층(5 mg/ml)에서 각각 0.37과 0.43으로 estrogen 유사효과를 나타내었다 (ANOVA $p < 0.001$). 홍화씨에 포함된 estrogen에 의한 전사활성 촉진 은 MCF7/pDS-CAT-ERE119- Ad2MLP system을 사용하여 estrogen 수용체와 reporter gene 발현을 이용하는 방법

으로 세포에 직접 처리함으로써 phytoestrogen 활성을 측정할 수 있었다.

감사의 글

홍화의 phytoestrogen 분석을 도와준 이상현 박사 (신라대학교 생명공학과) 에게 감사 드립니다. 본 연구는 신라대학교 교내학술연구비 (2001년도) 의 지원으로 수행되었음을 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Cleary, M. P., F. C. Phillips and R. A. Morton. 1999. Genotype and diet effects in lean and obese Zucker rats fed either safflower or coconut oil diets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **220**, 153-161.
2. Cox, C., J. Mann, W. Sutherland, A. Chisholm and M. Skeaff. 1995. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. *J. Lipid Res.* **36**, 1787-1795.
3. Diel, P., K. Smolnikar and H. Michna. 1999. *In vitro* test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. *Planta Med.* **65**, 197-203.
4. Folch, J., M. Lee and G. H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
5. Heo, J. 1986. *Dong-I Bogam* 5. pp. 2763-2764. 3th eds., In: Safflower. Yekang Publishers, Seoul, Korea.
6. Itoh, T., T. Tamura and T. Matsumoto. 1973. Sterol composition of 19 vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Sci.* **50**, 122-125.
7. Iwata, T., K. Ohya, F. Takehisa, K. Tsutsumi, Y. Furukawa and S. Kimura. 1992. The effect of dietary safflower phospholipid on sterols in gastrointestinal tract of rats fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **38**, 615-622.
8. Jeon, S. M., J. H. Kim, J. H. Lee, I. K. Lee, K. D. Moon and M. S. Choi. 1998. The effects of Korean safflower (*Carthamus tinctoriosus* L.) seed powder supplementation diet on bone metabolism indices in rats during the recovery of rib fracture. *Korean. J. Nutr.* **31**, 1049-1056.
9. Kang, G. H. 2001. Antioxidant activity of phenolic

- compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorious* L.) seeds. *MS Thesis*. Catholic University of Daegu, Daegu.
10. Kee Chang Huang. 1993. *The Pharmacology of Chinese Herbs*. CRC press, 249-250.
 11. Kim, M.-N. and K.-H. Kim 1992. Researches for analgesic and hepatoprotective action of *Carthami Flos*. *Pusan Bull. Pharm. Sci.* **26**, 32-36.
 12. Kim, J.-H., S.-M. Jeon, M.-Y. An, S.-K. Ku, J.-H. Lee, M.-S. Choi and K.-D. Moon. 1998. Effects of diet of Korean safflower (*Carthamus tinctorious* L.) seed powder on bone tissue in rats during the recovery of rib fracture. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 698-704.
 13. Kim, J.-H., S.-M. Jeon, Y.-A. Park, M.-S. Choi, and K.-D. Moon. 1999. Effects of safflower seed (*Carthamus tinctorious* L.) powder on lipid metabolism in high fat and high cholesterol-fed rats. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 625-631.
 14. Kim, S.-K., H.-J. Kim, B.-H. Jeong, J.-Y. Cha and Y.-S. Cho. 2000. Properties of the chemical composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Korean J. Life Sci.* **5**, 431-435.
 15. Kurzer, M. S. 2003. Phytoestrogen supplement use by women. *J. Nutr.* **133**, 1983-1986.
 16. Moon, K. D., S S. Back, J. H. Kim, S. M. Jeon, M. K. Lee and M. S. Choi. 2001. Safflower seed extract lowers plasma and hepatic lipids rats fed high-cholesterol. *Nutr. Res.* **21**, 895-904.
 17. Ponglikitmongkol, M., J. H. White and P. Chambon. 1990. Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J.* **9**, 2221-2231.
 18. Price, C. P. and P. W. Thomson. 1995. The role of Biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. *Ann. Clin. Biochem.* **30**, 244-260.
 19. Ra, D.-K., T.-S. Jung, J.-S. Kim, H.-R. Song, Y.-H. Kim, J.-B. Kang, H.-J. Kang, S.-C. Yeon, G.-W. Shin, M.-R. Park, E.-H. Kim and G.-S. Kim. 2002. Possible process of safflower seed on new bone formation by 2-dimension electrophoresis. *Korean. J. Vet. Clin.* **19**, 49-54.
 20. Roh, J. S., W. S. Sun, S. U. Oh, J. I. Lee, W. T. Oh and J. H. Kim. 1999. *In vitro* antioxidant activity of (*Carthamus tinctorious* L.) seed. *Food Sci. Biotechnol.* **8**, 88-92.
 21. Seo, H. J., J. H. Kim, D. Y. Kwak, S. M. Jeon, S. K. Ku, J. H. Lee, K. D. Moon and M. S. Choi. 2000. The effects of safflower seed powder and its fraction on bone tissue in rib-fractured rats during the recovery. *Korean. J. Nutr.* **33**, 411-420.
 22. Shim, S.-M. 200. Effects of the anticarcinogenic activity and phytoestrogen of *Punica granatum* L. *MS Thesis*. Silla University of Busan. Busan.
 23. Wuttke, W., H. Jarry, S. Westphalen, V. Christoffel, D. Seidlova-Wuttke. 2003. Phytoestrogens for hormone replacement therapy. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.* **1789**, 1-15.
 24. Zhang, H. L., A. Nagatsu, T. Watanabe, J. Sakakibara and H. Okuyama. 1997. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorious* L.) oil cake. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1910-1914.

(Received July 22, 2003; Accepted August 16, 2003)