

Changes in the lipid composition and bioactive compounds of walnut (*Juglans regia*) under different storage conditions: implications for future research on polycystic ovary syndrome (PCOS)

Dalma Máté¹, Szende Vancea², Elek Ferencz², Eszter Laczkó-Zöld³

¹Faculty of Nutrition and Dietetics, George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Târgu Mureș, ²Legal Medicine Service, Emergency County Hospital Miercurea Ciuc, ³George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Târgu Mureș Department of Pharmacognosy and Phytotherapy

Abstract • *Juglans regia* L., commonly known as walnut and belonging to the Juglandaceae family, is one of the major plant sources rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and may have medicinal potential. To utilise walnuts as a functional food, it is essential to investigate the changes that occur in their chemical composition under different storage conditions. The aim of the present study was to evaluate the lipid profile, total phenolic content (TPC), antioxidant capacity, and phytosterol content of *Juglans regia* walnut samples obtained from different harvest years and stored under various conditions. Samples were examined in both in-shell whole-walnut (WW) and shelled walnut-kernel (WK) forms. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis revealed that the fatty acid profile of the walnut samples was characterised by a predominance of linoleic acid. Our results showed that neither storage form nor harvest year caused substantial changes in fatty acid composition. Walnuts harvested in 2024 exhibited a higher total phenolic content than samples collected during the 2025 harvest; in the case of Tree 2, the 2024 WW samples had a significantly higher total phenolic content than the corresponding WK samples. A decrease in total phenolic content was observed in the 2025 samples stored in kernel form. No significant differences were detected in antioxidant activity, although the 2025 samples showed slightly lower values. Although no marked qualitative differences were observed in lipid composition, the thin-layer chromatographic profile suggested the presence of phytosterols. Overall, our findings indicate that the lipid composition of walnuts remained relatively stable under the investigated storage conditions, whereas the effects of storage form and harvest year were evident for certain bioactive constituents. Further studies are required to confirm the clinical relevance of the observed associations.

Keywords • *Juglans regia*, polyunsaturated fatty acids (PUFAs), phenolic compounds, storage conditions, polycystic ovary syndrome (PCOS)

DOI: 10.2478/orvtudert-2026-0009

Bulletin of Medical Sciences 2026, 99(2): 125–146

Corresponding author

Eszter Laczkó-Zöld

Department of Pharmacognosy and Phytotherapy, George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Târgu Mureș
Gh. Marinescu street 38, 540139
Târgu Mureș, România
eszter.laczko@umfst.ro

Introduction

Lipids play a key role in human health, and nuts are considered excellent sources of dietary lipids. *Juglans regia* L., commonly known as walnut, is one of the oldest cultivated and most widely distributed plants worldwide [1]. It belongs to the Juglandaceae family and is also referred to as the English or Persian walnut [2]. The

polyunsaturated fatty acids (PUFAs) present in walnuts may contribute to the maintenance of cardiovascular, metabolic, reproductive, and neurological homeostasis [3,4]. The predominant fatty acid is linoleic acid (C18:2, n-6), which accounts for approximately 50-73% of the total fatty acid composition [5-7]. The principal omega-3 fatty acid, α -linolenic acid (ALA; C18:3, n-3), represents 12-18% of the total fatty acid content [5]. This rich lipid composition makes walnuts particularly susceptible to oxidative deterioration [2,5,8]. Therefore, the bioactive compounds present in walnuts, together with their antioxidant capacity, are essential for preserving walnut quality by mitigating oxidative processes [1,9,10]. Following mechanical cracking and the removal of the pellicle and internal septum, the natural barriers against oxidation are lost [8,11], further emphasising the importance of these bioactive constituents.

Flavonoids constitute a key group of polyphenols characterised by an aromatic ring structure. They inhibit lipid oxidation, activate antioxidant enzymes, and suppress the activity of oxidative enzymes [1]. The flavonoid content of walnuts is influenced by environmental factors, including temperature, oxygen exposure [1], and storage duration [8]. Their concentrations generally decrease during storage, most likely owing to the activity of polyphenol oxidase (PPO). Walnuts also contain substantial amounts of phenolic acids, flavonols, and flavanols. These compounds contribute to the antioxidant and anti-inflammatory properties of walnuts, thereby enhancing their biological value [1,5]. The total phenolic content of walnut oil and walnut press cake is commonly expressed as gallic acid equivalents (GAE), which represent a widely used reference unit for the quantitative determination of phenolic compounds [1,9].

The tocopherol content of walnuts also plays an important role in protecting the kernels. *Juglans regia* contains considerable amounts of γ -tocopherol, which enhances the antioxidant activity of the oil and prolongs its shelf life [2]. Among the tocopherol isoforms, α -tocopherol is the most reactive and least stable. It has been proposed that this isoform is mobilised first to inhibit oxidative processes [5].

The phytosterol content of walnuts represents an additional advantage associated with the consumption of oilseeds. Phytosterols have a structure similar to that of cholesterol and compete with dietary cholesterol during intestinal absorption, thereby potentially reducing low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) concentra-

tions. β -Sitosterol, Δ^5 -avenosterol, and campesterol are the main phytosterols present in walnuts. Their concentrations may decrease during heat treatment and oxidative deterioration [2].

Through their anti-inflammatory and metabolic regulatory effects, PUFAs may contribute to the management of menstrual disorders and insulin resistance [12-14]. ALA is present in walnuts in significant amounts; however, further clinical studies are needed to confirm whether walnuts can be used as a functional food in the management of reproductive and menstrual disorders [12,13,15]. Chronic inflammation and oxidative stress may mutually potentiate each other in metabolic and reproductive disorders. Reactive oxygen species (ROS) may promote lipid peroxidation and adversely affect steroidogenesis [16]. Therefore, increasing attention has been directed towards the role of dietary antioxidants and polyunsaturated fatty acids [12,14].

The aim of the present study was to compare the lipid profile, total phenolic content, antioxidant capacity, and phytosterol content of *Juglans regia* samples obtained from different harvest years and stored under varying conditions. We hypothesised that walnuts stored for longer periods or in shelled form would exhibit less favourable oxidative and bioactive parameters. As the bioactive compounds of walnuts may potentially contribute to the support of reproductive and metabolic health, investigating their use as a functional food may also be relevant in the context of menstrual disorders, including amenorrhoea associated with polycystic ovary syndrome (PCOS), also referred to in newer terminology as polyendocrine metabolic ovarian syndrome (PMOS). To address this issue, it is first important to understand how the lipid composition and bioactive profile of walnuts are influenced by different factors.

Materials and Methods

Sample Collection and Storage

Walnut samples (*Juglans regia* L.) were collected from two individual trees (Tree 1 and Tree 2) located in the village of Bădeni, Harghita County, Romania (46°13.04.0 N, 25°20.51.0 E). The identification codes assigned to the samples, together with the harvest year and storage conditions, are summarised in Table 1. Voucher specimens were deposited at the Department of Pharmacognosy and Phytotherapy, George Emil Palade University of

Table 1. Identification of walnut samples according to harvest year, tree origin, and storage conditions

Sample	Code	Tree	Harvest year	Storage form
Sample 1	AS/0109/2024	1	2024	WW
Sample 2	AS/0109/2024	1	2024	WW
Sample 3	AS/0209/2024	2	2024	WW
Sample 4	AS/0209/2024	2	2024	WW
Sample 5	AS/0109/2024	1	2024	WK
Sample 6	AS/0109/2024	1	2024	WK
Sample 7	AS/0209/2024	2	2024	WK
Sample 8	AS/0209/2024	2	2024	WK
Sample 9	AS/0110/2025	1	2025	WK
Sample 10	AS/0210/2025	2	2025	WK

WW - whole walnut; WK - walnut kernel

Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Târgu Mureş, Romania. Samples were obtained from two harvest years, namely 2024 and 2025.

The WW samples originating from the 2024 harvest were stored at room temperature for approximately one year. In June 2025, a portion of these walnuts was manually cracked, and the resulting WK samples were stored for an additional four months until analysis. Walnuts harvested in 2025 were analysed shortly after cracking and exclusively in WK form. All samples were stored in paper bags at room temperature (22–23 °C).

Walnuts were manually cracked using a conventional mechanical method to preserve kernel integrity. Before oil extraction, the kernels were ground using a laboratory mill. Grinding was performed immediately before oil extraction to minimise oxidative changes. For each extraction, 20 g of ground sample was weighed (± 0.008 g). Samples were analysed in biological duplicate. However, in the case of two walnut samples from the 2025 harvest, the first set of samples had to be excluded from the analyses because of insufficient drying; therefore, only samples obtained from the second set were processed. Data for the excluded samples are not shown in **Table 1**.

Reagents and Reference Standards

Petroleum ether used for the extraction procedure was obtained from Chimreactiv SRL (Romania), while ethanol (96%) was purchased from SC ELI CHEMTRADE SRL (Romania). HPLC-grade methanol used for the different separation procedures was supplied by Fisher Scientific (Loughborough, United Kingdom), whereas n-hexane (HPLC grade), sodium hydroxide ($\geq 99\%$), and

Folin-Ciocalteu reagent were obtained from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany). Gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), phosphomolybdic acid, rhodamine B, and HPLC-grade toluene were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Anhydrous sodium carbonate was supplied by Labkem (Barcelona, Spain), dichloromethane by Honeywell Riedel-de Haën GmbH (Germany), petroleum ether and diethyl ether by Merck (Darmstadt, Germany), glacial acetic acid by Silal Trading SRL (Romania), and acetone by SC Mobil Dacami Impex SRL (Romania).

Reference standards of α -tocopherol, α -linolenic acid, linoleic acid, and palmitic acid used for the gas chromatographic analyses were obtained from MedChemExpress (USA).

Oil Extraction

Oil extraction was performed using a Soxhlet apparatus according to the protocol described by Wang et al. [17]. Petroleum ether was used as the extraction solvent at 76 °C for 4 h, with a solid-to-solvent ratio of 1:7 (20 g of sample to 140 mL of solvent). After extraction, the solvent was removed using a rotary vacuum evaporator (Janke & Kunkel IKA Labortechnik RV 05-ST). Oil content was calculated as follows:

$$\text{Oil content (\%)} = (\text{mass of extracted oil} / \text{mass of initial dry kernel}) \times 100$$

The extracted oils were stored at 4 °C until further analysis. The remaining defatted walnut press cake was removed from the extraction thimble, dried, and stored at 4 °C until further analysis.

Determination of the Fatty Acid Composition of Walnut Oil

The lipid composition of walnut oil was analysed after the preparation of fatty acid methyl esters (FAMES) according to the AOCS method of the American Oil Chemists' Society [18]. Briefly, 100 mg of walnut oil was dissolved in 2 mL of n-hexane and homogenised with 0.2 mL of 2 M methanolic NaOH solution for 60 s, followed by incubation at room temperature for 20 min. The resulting samples were analysed after 100-fold dilution.

Chromatographic separation was performed on an HP-5MS UI capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) using an Agilent 7890B gas chromatograph coupled to an Agilent 5977A MSD mass spectrometer, according to the modified method of Masoodi [19]. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Samples were injected in splitless mode, with an injection volume of 1 µL and an injector temperature of 250 °C. The oven temperature programme was initiated at 60 °C and maintained for 1 min, followed by an increase at a rate of 10 °C/min to 250 °C, where it was held for 5 min. The mass spectrometer was operated in electron ionisation (EI) mode at an ionisation energy of 70 eV. The temperatures of the ion source and quadrupole were set at 230 °C and 150 °C, respectively. Mass spectra were acquired over the m/z range of 40–500.

Fatty acid methyl esters (FAMES) were identified by comparing the acquired mass spectra with reference spectra from the NIST 14 and MPW 5e libraries. The relative proportions of fatty acids in the analysed samples were estimated using the peak area percentage method. In this approach, the cumulative area of all detected peaks was considered to represent 100%, and the area of the peak corresponding to the compound of interest was expressed as a percentage of the total peak area.

Determination of Free Fatty Acids And Volatile Compounds

The GC-MS method described above was used to identify free fatty acids and volatile compounds present in walnut oil and in the residual press cake obtained after oil extraction. For this purpose, 0.050 g of walnut oil was dissolved in 1 mL of n-hexane and subsequently subjected to a further tenfold dilution. No additional dilution was applied to the ethanolic extracts of walnut press cake. Compound identification was based on retention time (Rt) and mass spectra using the NIST mass spectral database; only compounds with a match quality above 85 were considered.

Determination of the Antioxidant Activity of Walnut Oil by the DPPH Assay

The free radical scavenging capacity of walnut oil samples was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, applying a method adapted for fatty oils [2]. A 1 mM DPPH stock solution was prepared in toluene. The working solution (0.1 mM) was subsequently obtained by tenfold dilution with toluene. Fatty oil samples (0.100 g ± 0.003 g) were dissolved in 1 mL of toluene and mixed for 30 s using a Tube Revolver (Thermo Scientific, USA) to ensure homogenisation. Subsequently, 2900 µL of 0.1 mM DPPH reagent solution was added. The reaction mixtures were incubated in the dark at room temperature for 30 min, after which absorbance was measured at 517 nm.

Negative controls were prepared for each analytical series by replacing the oil sample with toluene. Radical scavenging activity (%RSA) was calculated separately for each series according to the following equation:

$$\%RSA = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

where A_{control} is the absorbance of the negative control and A_{sample} is the absorbance of the tested oil sample.

Determination of the Antioxidant Activity of Walnut Press Cake by the DPPH Assay

The antioxidant activity of ethanolic extracts obtained from walnut press cake was determined using the DPPH assay [1], with a methanolic DPPH solution. For the measurement, 1500 µL of 0.1 mM DPPH solution was added to 100 µL of ethanolic extract. Following incubation for 15 min at room temperature in the dark, absorbance was measured at 517 nm using a UV/Vis spectrophotometer. The absorbance of the DPPH solution served as the control. Antioxidant activity was expressed as the percentage of DPPH scavenging activity and calculated according to the following equation:

$$\%Inhibition = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

where A_{control} is the absorbance of the DPPH solution and A_{sample} is the absorbance of the reaction mixture containing the extract.

Determination of the Total Phenolic Content (TPC) of Walnut Press Cake

The total phenolic content of defatted walnut press cake was determined using the Folin-Ciocalteu method [20].

Briefly, 0.2 g of defatted walnut press cake was extracted with 10 mL of ethanol in an ultrasonic bath for 15 min. Following centrifugation, the residue was re-extracted under the same conditions. The combined supernatants were used for the analysis. An aliquot of 40 µL of extract was mixed with 3.16 mL of distilled water and 200 µL of Folin-Ciocalteu reagent. After 30 s of mixing and 8 min of incubation, 600 µL of 20% sodium carbonate solution was added. The samples were incubated in the dark at room temperature for 2 h. Absorbance was measured at 765 nm using a UV/Vis spectrophotometer (JK-UVS-752 N). Total phenolic content was expressed as gallic acid equivalents using a gallic acid reference solution.

The calibration curve was established using gallic acid standard solutions within a concentration range of 50–400 mg/L. Polyphenol concentrations were calculated from the regression equation ($x = [y + 0.0194] / 0.0012$, $R^2 = 0.9955$) and expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW).

$$\text{mg GAE/g} = (C \times V) / m$$

where C is the concentration obtained from the calibration curve (mg/L), V is the extraction volume (0.02 L), and m is the sample mass.

Thin-Layer Chromatography (TLC) Analysis of Walnut Oils

Thin-layer chromatography (TLC) was employed for the qualitative evaluation of the lipid composition of walnut oil samples, according to the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 11th edition [21]. Prior to application, 20 mg of each oil sample was dissolved in 1–1.5 mL of dichloromethane. Olive oil, β -sitosterol, and stigmaterol reference standards (20 mg/mL in dichloromethane) were used for comparison.

Chromatographic separations were performed on normal-phase silica gel plates (ALUGRAM® SIL G/UV254, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) and reversed-phase plates (RP-18, F254S, 0.25 mm, Merck, Darmstadt, Germany). For normal-phase separations, petroleum ether and a petroleum ether-diethyl ether-glacial acetic acid mixture (23.5:5:1.5, v/v/v) were used as mobile phases. Reversed-phase plates were developed using a dichloromethane-glacial acetic acid-acetone mixture (20:40:50, v/v/v).

After development, the plates were air-dried, and the separated components were visualised either by phos-

phomolybdc acid derivatisation followed by heating at 120 °C for 3 min, or by rhodamine B staining and observation under UV light at 365 nm (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Lipid components were identified based on their chromatographic behaviour (R_f values) and comparison with reference oils and phytosterol standards.

Statistical Analysis

Results are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical differences between groups were evaluated using Welch's two-sample t-test implemented in Microsoft Excel. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

For statistical analysis of the fatty acid profile, non-detectable (n.d.) values were replaced with the corresponding values obtained from the biological duplicate, except in cases where the component was not detected in either replicate.

Results

Oil Yield

Among the samples collected in 2024, those originating from Tree 2 showed a lower oil content than those from Tree 1 in both the WW and WK groups; however, these differences were not statistically significant ($p = 0.08$ and $p = 0.07$, respectively). Among the WK samples, a statistically significant difference was observed for Tree 2 between the 2024 and 2025 harvest years ($p \leq 0.001$), as

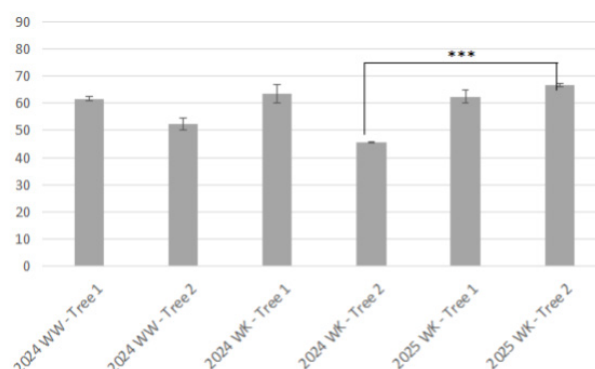


Figure 1. Oil content (%) of walnut samples originating from different trees, grouped according to harvest year and storage form. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). WW - whole walnut; WK - walnut kernel. *** $p \leq 0.001$

Table 2. Effect of storage conditions on the fatty acid composition of walnut oil. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

Fatty acid (%)	2024 WW - Tree 1	2024 WW - Tree 2	2024 WK - Tree 1	2024 WK - Tree 2	2025 WK - Tree 1	2025 WK - Tree 2
C16:0	13.34 $\pm$ 0.31	14.05 $\pm$ 0.03	13.58 $\pm$ 0.31	15.27 $\pm$ 1.11	14.90 $\pm$ 0.00	15.90 $\pm$ 0.00
C18:0	5.31 $\pm$ 0.04	5.06 $\pm$ 0.02	4.87 $\pm$ 0.03	5.28 $\pm$ 0.24	5.32 $\pm$ 0.00	5.25 $\pm$ 0.00
C18:1	11.42 $\pm$ 0.00	17.24 $\pm$ 2.09	17.92 $\pm$ 0.00	8.56 $\pm$ 0.00	15.99 $\pm$ 0.00	15.12 $\pm$ 0.00
C18:2	55.85 $\pm$ 0.93	56.81 $\pm$ 1.96	55.13 $\pm$ 1.23	56.57 $\pm$ 1.34	57.94 $\pm$ 0.00	57.62 $\pm$ 0.00
C18:3	13.01 $\pm$ 5.67	n.d.	19.20 $\pm$ 0.00	11.63 $\pm$ 5.85	n.d.	n.d.
C20:1	0.62 $\pm$ 0.07	0.54 $\pm$ 0.07	0.59 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.08	0.63 $\pm$ 0.00	0.61 $\pm$ 0.00
SFA	18.65 $\pm$ 0.27	19.10 $\pm$ 0.00	18.45 $\pm$ 0.28	20.54 $\pm$ 1.34	20.22 $\pm$ 0.00	21.15 $\pm$ 0.00
MUFA	12.04 $\pm$ 0.07	17.77 $\pm$ 2.01	18.51 $\pm$ 0.03	9.18 $\pm$ 0.08	16.62 $\pm$ 0.00	15.73 $\pm$ 0.00
PUFA	68.85 $\pm$ 4.74	56.81 $\pm$ 1.96	74.33 $\pm$ 1.23	68.19 $\pm$ 7.18	57.94 $\pm$ 0.00	57.62 $\pm$ 0.00

shown in **Figure 1**. The difference in oil content between the WK samples from the two harvest years was 10.37%.

Fatty Acid Composition of Walnut Oils

The lipid composition of the walnut oil samples analysed by GC-MS was dominated primarily by polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (**Table 2**). Linoleic acid (C18:2) was present in the highest proportion, followed by palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0). α -Linolenic acid (C18:3) was present in substantial amounts in several samples; however, using the predefined identification criterion of Qual >85, it was not detectable in some samples. A similar pattern was observed for C18:1 fatty acids; however, during statistical processing, missing values were replaced with the corresponding values measured in the biological duplicate. Eicosenoic acid (C20:1) was present only in small amounts in all samples.

When the fatty acid profiles of the samples were compared, no statistically significant differences were found for most of the analysed components. However, a significant difference was observed in the proportion of stearic acid (C18:0) between the 2024 WW samples from the two examined trees ($p = 0.046$), as well as between the WW and WK samples from Tree 1 collected in the same year

($p = 0.016$). The remaining statistically significant results were obtained from comparisons in which non-detected values had been replaced during data processing.

Tocopherols and Other Bioactive Components

GC-MS analysis revealed the presence of several fat-soluble bioactive compounds in the walnut oil samples. The consistently detected components are shown in **Table 3**.

γ -Tocopherol was identifiable in all analysed samples, whereas squalene was detected in five of the ten examined samples. 2,4-Di-tert-butylphenol was also detected in all samples. However, because the origin of this compound could not be clearly established in the present study, its biological significance was not interpreted.

Volatile Components and Free Fatty Acids in Untreated Walnut Oil and Walnut Press Cake Samples

In the walnut oil samples diluted with hexane, only D-limonene could be clearly identified; this volatile component was present in all samples.

Six aroma compounds were identified in the ethanolic extracts of walnut press cake (**Table 4**). The most frequently occurring components were 5-methyl-3-heptanol and D-limonene. 3-Octanone was detectable in only two

Table 3. Occurrence of γ -tocopherol and squalene identified in walnut oil samples

Tocopherols and bioactive compounds	RT (min)	2024 WW - Tree 1	2024 WW - Tree 2	2024 WK - Tree 1	2024 WK - Tree 2	2025 WK - Tree 1	2025 WK - Tree 2
Squalene	26.658	+	+	$\pm$	-	-	-
γ -Tocopherol	28.334	+	+	+	+	+	+

RT - retention time; "+" = present; " $\pm$ " = present in one of the duplicate samples; "-" = not detected.

Table 4. Changes in the volatile components of walnut samples according to storage conditions

Sample groups	RT (min)	Volatile compound	2024 WW - Tree 1	2024 WW - Tree 2	2024 WK - Tree 1	2024 WK - Tree 2	2025 WK - Tree 1	2025 WK - Tree 2
Walnut oil samples diluted in n-hexane	5.427	D-limonene	+	+	+	+	+	+
Ethanolic extracts of defatted walnut press cake	4.351	3-Octanone	±	-	-	-	-	+
	4.427	3-Heptanol, 5-methyl-	±	+	+	+	+	-
	5.456	D-limonene	+	+	±	±	+	+
	5.522	o-Cymene	-	±	-	-	-	-
	5.622	Eucalyptol	-	±	±	±	+	-
	5.972	γ-Terpinene	-	-	±	-	-	-
	7.267	Camphor	-	±	-	±	-	-

samples, whereas o-cymene, eucalyptol, γ-terpinene, and camphor were present only in selected samples.

In addition to aroma compounds, small amounts of free fatty acids were also identified in the walnut press cake samples, primarily in the form of linoleic acid (C18:2) and palmitic acid (C16:0).

Antioxidant Activity of Walnut Oil

The free radical scavenging activity of the walnut oil samples was determined using the DPPH assay, and the results were expressed as percentage inhibition.

The DPPH free radical scavenging activity of the walnut oil samples ranged from $10.00 \pm 0.91\%$ to $19.36 \pm 10.31\%$. The mean inhibition values of the 2024 WW and WK samples were $17.75 \pm 9.43\%$ and $19.36 \pm 10.31\%$, respectively, whereas the 2025 WK samples showed lower mean activity ($10.00 \pm 0.91\%$). However, the differences between groups were not statistically significant with respect to either storage form ($p = 0.848$) or harvest year ($p = 0.214$). No significant difference was observed between the two examined trees ($p = 0.980$). Considerable variability was observed among the samples, particularly in the 2024 sample groups.

Antioxidant Activity of Walnut Press Cake

The antioxidant activity of the ethanolic extracts of walnut press cake was determined using the DPPH assay and expressed as the percentage of DPPH inhibition. Antioxidant activity ranged from $70.26 \pm 1.82\%$ to $90.59 \pm 1.06\%$ in the analysed samples. Statistical comparison showed no significant difference between the 2024 WW and WK samples or between the 2024 and 2025 WK sam-

ples. No statistically significant difference in antioxidant activity was observed between the two examined trees. The results are shown in **Figure 2**.

Total Phenolic Content in Walnut Press Cake

The total phenolic content (TPC) of the walnut press cake samples was determined using the Folin-Ciocalteu method, and the results were expressed as mg gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW). Based on individual measurements, TPC values ranged from 6.28 to 62.28 mg GAE/g DW (**Figure 3**).

Statistical analysis revealed a significant difference between the WW and WK samples from the 2024 harvest, particularly in walnuts originating from Tree 2 ($p = 0.008$). The lowest TPC values were obtained for the 2025 WK samples (6.28 ± 1.2 mg GAE/g). Although a decrease

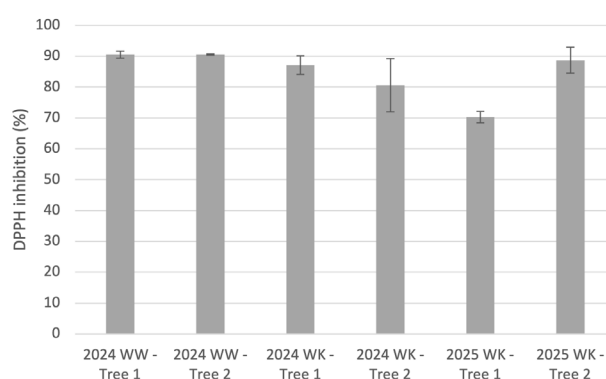


Figure 2. DPPH free radical scavenging activity (%) of ethanolic extracts of walnut press cake. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). WW - whole walnut; WK - walnut kernel

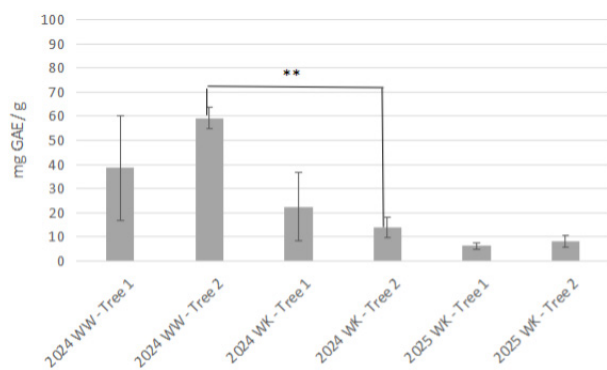


Figure 3. Total phenolic content of walnut press cake (mg GAE/g DW). Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). GAE - gallic acid equivalents; WW - whole walnut; WK - walnut kernel. ** $p < 0.05$

was observed compared with the 2024 WK samples, the difference was not statistically significant ($p > 0.2$).

Thin-Layer Chromatographic Analysis of Walnut Oils

Before GC analysis, thin-layer chromatographic (TLC) analysis was performed on walnut oil samples from the extraction series to qualitatively evaluate lipid composition, according to the Ph. Eur. method. Overall, the chromatographic profiles of the different walnut oil samples were similar, with only minor differences in band position and intensity. Detailed TLC results are available in the Supplementary Material.

Discussion

According to the literature, the use of *Juglans regia* L. in dietary or research contexts is most often justified by the favourable lipid profile of the walnut kernel. Walnuts contain approximately 52-70% fat [2,5], and the quality of these lipids is further enhanced by numerous bioactive components. The present study investigated the oil content of walnut samples, which, after Soxhlet extraction, did not show significant differences between the sample groups according to harvest year (2024 vs. 2025) or storage form (WW vs. WK). The mean oil content of all samples subjected to extraction was 57.53%, which is comparable to the Soxhlet extraction yield reported by Wang et al. [17] (58.29%). Factors influencing extraction efficiency include genotype-related variability [22] and the extraction method used [17]. Iordanescu et al. [22] reported differences of more than 10% in the oil content

of Romanian walnut genotypes. A similar difference was observed in the present study, supporting the existence of variability between the fruits of the two examined trees.

The fatty acid composition of the analysed walnut samples followed the pattern characteristic of *Juglans regia*, namely the predominance of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [5,7]. Within the PUFA fraction, linoleic acid was identified as the dominant component, accounting for more than half of the total fatty acid content of the walnut samples, in agreement with previously published data [7,22].

ALA was not detected in certain samples, which limits the interpretation of the fatty acid profile. However, where it was detected, including in the 2024 WW samples from Tree 1 and the 2024 WK samples from Tree 1 and Tree 2, its concentration was generally consistent with values reported in the literature (12-18%) [2,5], although lower values were observed in some cases. As the presence of ALA has been confirmed in studies involving different genotypes and storage conditions [2,5,22], it is likely that the non-detectable values observed in certain samples were attributable to methodological or identification-related limitations.

A statistically significant difference was observed in the proportion of stearic acid ($p = 0.04$) between the 2024 WW samples originating from the two examined trees. This difference may be attributable to genotype-related variation. In the study by Iordanescu et al. [22], stearic acid concentrations ranged from 3.28% to 6.50%, indicating an even greater degree of variability than that observed in the present study.

According to our results, neither storage form nor harvest year substantially affected the overall structure of the fatty acid profile. Contrary to our expectations, no trend was observed indicating that walnuts stored in-shell had a more favourable fatty acid composition, and the more recently harvested samples likewise did not exhibit a consistently different profile. Similar observations have been reported in previous studies investigating storage effects, suggesting that, as oxidative processes progress, antioxidant components, oxidative markers, and sensory characteristics are affected before detectable alterations occur in fatty acid composition, which may remain stable for a longer period [5,8].

From a physiological perspective, the consumption of PUFA-rich foods is of considerable importance. An appropriate balance between omega-6 and omega-3 fatty acids may contribute to the regulation of inflammatory pro-

cesses and the maintenance of metabolic health [12,23]. In the present study, the results regarding the presence of ALA were inconsistent; therefore, the omega-6/omega-3 ratio could not be assessed for all samples. In the sample groups in which ALA was detected, walnuts may represent a potentially favourable source of essential omega-3 fatty acids. However, the physiological significance of ALA is difficult to evaluate fully, as its conversion to EPA and DHA in the human body is limited [15].

Because of its high PUFA content, walnut is particularly susceptible to lipid oxidation, during which numerous volatile compounds may be formed [5]. However, the analysis of walnut oil samples dissolved in n-hexane and ethanolic extracts of defatted walnut press cake did not reveal substantial amounts of aldehydes or other oxidation markers commonly associated with walnut rancidity that would indicate advanced lipid oxidation.

Among the volatile compounds detected in the samples, terpene-related components predominated. D-limonene was identified in the untreated walnut oil samples, whereas o-cymene, eucalyptol, γ -terpinene, and camphor were detected in the ethanolic extracts of defatted walnut press cake in addition to D-limonene. The identified compounds are part of the natural volatile fraction of walnut [24].

The presence of free fatty acids was also investigated in the ethanolic extracts. Among these, only linoleic acid (C18:2) and palmitic acid (C16:0) were detectable, both at relatively low levels.

No statistically significant differences in the antioxidant activity of the walnut oil samples were observed with respect to either harvest year or storage form. Nevertheless, the mean DPPH inhibition of the 2025 samples was lower than that of the 2024 samples. The interpretation of these results is considerably limited by the high variability observed within the 2024 sample groups. According to the GC-MS analyses, the overall structure of the fatty acid profile remained stable, and no substantial amounts of oxidation markers were detected. These findings are consistent with the results obtained from the DPPH assay. Although the use of toluene facilitates the dissolution of oil samples, it may also contribute to analytical variability, which could partly explain the large standard deviations observed. Consequently, the results of this analysis should be interpreted with caution.

The DPPH assay applied to ethanolic extracts of walnut press cake showed minor differences between walnut samples from different harvest years and between sam-

ples stored in-shell or as kernels (Figure 2). As expected, the in-shell samples exhibited higher antioxidant activity (Tree 2: $90.59 \pm 0.17\%$) than the kernel samples (Tree 2: $80.63 \pm 8.57\%$). Although the 2024 WW samples showed higher antioxidant activity, the difference was not statistically significant, probably because of the limited number of biological replicates. Garcia-Mendoza et al. [25] demonstrated that phenolic content is closely related to DPPH activity, which is consistent with the results of the present study. During oil extraction, phenolic compounds accumulate in the remaining press cake, which may explain the stronger DPPH inhibitory activity of the ethanolic extracts of walnut press cake. Similar observations were reported by Zhou et al. [26], who investigated the antioxidant activity of defatted walnut press cake extracts, including by the DPPH assay. They observed significant free radical scavenging activity in fractions rich in phenolic compounds. The association between the higher antioxidant activity of defatted walnut press cake extracts and the TPC results suggests that phenolic compounds may contribute substantially to the observed free radical scavenging activity.

We examined the total phenolic content of defatted walnut press cake obtained after Soxhlet extraction. Storage form had a significant impact on phenolic content, most likely because of the protective bioactive compounds present in the walnut shell and septum. The walnut shell and associated tissues form a phenolic-rich natural protective barrier that may help mitigate oxidative processes [8,11]. Recommended storage methods for preserving phenolic content include refrigeration, modified-atmosphere packaging, and in-shell storage [1,10].

Walnut phenolics include flavanols, flavonols, and phenolic acids, which contribute to the biological value of walnuts through their antioxidant and anti-inflammatory effects [1,5]. A decreasing trend in phenolic content ($p = 0.109$) has been observed during walnut ripening. The total phenolic content of samples from Tree 1 collected in 2025 was 6.28 ± 1.2 mg GAE/g, representing the lowest TPC value in the present study. These results may have been influenced by the limited number of biological replicates. Cui et al. [9] reported a similar process, showing a gradual decrease in free gallic acid of almost 60% as walnut ripening progressed. A substantial proportion of phenolic compounds is concentrated in the outer layers of the walnut [9,27]. Tree 2, whose fruits had a lower oil content, showed a higher total phenolic content, suggesting that lipid accumulation and phenolic biosynthesis

may be regulated independently and may reflect genotype-specific metabolic distribution patterns.

Based on the pattern obtained by thin-layer chromatographic analysis, the walnut oil samples showed similar profiles, indicating that their lipid composition was largely comparable from a qualitative perspective. The bands observed in the walnut samples and in the olive oil sample appeared in distinct Rf ranges. Bands with higher Rf values indicate the presence of less polar lipid fractions. In vegetable oils, these typically consist of triacylglycerols [28]. Weak, diffuse bands were observed in the intermediate Rf region, whereas the phytosterol standards exhibited well-defined bands, facilitating comparison with components showing similar migration behaviour. The chromatographic profiles of the walnut oil samples showed similarities to those obtained for olive oil. In addition, several bands migrated within Rf ranges comparable to those of the phytosterol standards, suggesting the possible presence of phytosterol-like compounds.

From a physiological perspective, PCOS is one of the most frequently studied endocrine disorders among women of reproductive age. Menstrual cycle disturbances, such as oligomenorrhoea or amenorrhoea, are common features of the syndrome [13,29]. In PCOS, chronic low-grade inflammation is often observed and is accompanied by elevated inflammatory biomarkers, while oxidative stress contributes to the development of metabolic and reproductive disorders [4,12,16]. Increased levels of reactive oxygen species (ROS) and inflammatory mediators may contribute to the development of metabolic and reproductive abnormalities, partly through adverse effects on insulin signalling and steroidogenesis [16]. Consequently, PUFAs have attracted increasing attention in PCOS research, as they may modulate inflammatory processes, insulin sensitivity, and the expression of genes involved in lipid and glucose metabolism [4,12,13,23]. Although most studies have focused on marine-derived omega-3 fatty acids, ALA, the omega-3 fatty acid present in walnuts, may also contribute to beneficial metabolic and anti-inflammatory effects [15].

Although this study did not examine clinical outcomes, maintaining the stability of walnut-derived polyunsaturated fatty acids and antioxidant compounds during storage may be relevant when considering the use of walnuts in dietary strategies aimed at supporting metabolic and reproductive health.

Conclusions

Based on our findings, the fatty acid profile of *Juglans regia* remained relatively stable under the investigated storage conditions, with linoleic acid predominating across all sample groups. Storage form and harvest year primarily influenced total phenolic content and antioxidant activity. GC-MS analysis identified mainly terpene-related compounds in the samples, whereas no substantial amounts of oxidation markers were detected. Thin-layer chromatographic analysis further suggested the presence of phytosterols. Our findings contribute to a better understanding of the bioactive components of walnut and defatted walnut press cake. Nevertheless, further studies are required to confirm the observed associations and to verify their potential role in the dietary support of PCOS.

List of Abbreviations

- ALA - alpha-linolenic acid
- DHA - docosahexaenoic acid
- DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- EI - electron ionisation
- EPA - eicosapentaenoic acid
- FAME - fatty acid methyl esters
- GAE - gallic acid equivalents
- GC-MS - gas chromatography-mass spectrometry
- LDL-C - low-density lipoprotein cholesterol
- MUFA - monounsaturated fatty acids
- n.d. - not detected
- NIST - National Institute of Standards and Technology
- PCOS - polycystic ovary syndrome
- Ph. Eur. - European Pharmacopoeia
- PMOS - polyendocrine metabolic ovarian syndrome
- PPO - polyphenol oxidase
- PUFA - polyunsaturated fatty acids
- Rf - retardation factor
- ROS - reactive oxygen species
- RSA - radical scavenging activity
- RT - retention time
- SD - standard deviation
- SFA - saturated fatty acids
- TLC - thin-layer chromatography
- TPC - total phenolic content
- WK - walnut kernel
- WW - whole walnut

Acknowledgements

This research was funded by the Section of Medical and Pharmaceutical Sciences of the Transylvanian Museum Society and the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Semmelweis University, Hungary (301/2026/P.2/EMEOGYSZ).

References

- Ahad T, Gull A, Nissar J, Masoodi L, Rather AH. Effect of storage temperatures, packaging materials and storage periods on antioxidant activity and non-enzymatic browning of antioxidant treated walnut kernels. *Journal of Food Science and Technology*. 2020;57(10). doi:10.1007/s13197-020-04387-5
- Elouafy Y, El Idrissi ZL, El Yadini A, Harhar H, Alshahrani MM, AL Awadh AA, Goh KW, Ming LC, Bouyahya A, Tabyaoui M. Variations in Antioxidant Capacity, Oxidative Stability, and Physicochemical Quality Parameters of Walnut (*Juglans regia*) Oil with Roasting and Accelerated Storage Conditions. *Molecules*. 2022;27(22). doi:10.3390/molecules27227693
- Harayama T, Shimizu T. Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. *Journal of Lipid Research*. 2020;61(8). doi:10.1194/JLR.R120000800
- Chung MY, Kim BH. Fatty acids and epigenetics in health and diseases. *Food Science and Biotechnology*. 2024;33(14). doi:10.1007/s10068-024-01664-3
- Ampofo J, Grilo FS, Langstaff S, Wang SC. Oxidative Stability of Walnut Kernel and Oil: Chemical Compositions and Sensory Aroma Compounds. *Foods*. 2022;11(19). doi:10.3390/foods11193151
- Bhardwaj A, Singh A, Patnaik RS, Bhardwaj S. *Juglans Regia* L: A Review of its Traditional Uses Phytochemistry and Therapeutic Applications. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*. 2023;14(1).
- Temizyürek F, Gündeşli MA, Canbay Y, Özatar HO, Gölcü E, Altun VC, Atagül Ö, Güney M, Kafkas E, Ugur R, Sütyemez M. Evaluation of biochemical profiles in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes and predictive modeling using advanced machine learning algorithms. *European Food Research and Technology*. 2025;251(10). doi:10.1007/s00217-025-04826-7
- Yurdunuseven Yildiz A, Karaca H. The protective role of shell, packaging technique and storage temperature in lipid oxidation in walnuts of different varieties. *Postharvest Biology and Technology*. 2024;210. doi:10.1016/j.postharvbio.2023.112747
- Cui M, Mo R, Li Q, Wang R, Shen D, Tang F, Liu Y. Maturation-induced changes in phenolic forms and their antioxidant activities of walnuts: A dual view from kernel and pellicle. *Food Chemistry: X*. 2024;23. doi:10.1016/j.fochx.2024.101792
- Ma Y, Wang C, Liu C, Tan J, Ma H, Wang J. Physiochemical responses of the kernel quality, total phenols and antioxidant enzymes of walnut in different forms to the low-temperature storage. *Foods*. 2021;10(9). doi:10.3390/foods10092027
- Verde A, Míguez JM, Leao-Martins JM, Gago-Martínez A, Gallardo M. Melatonin content in walnuts and other commercial nuts. Influence of cultivar, ripening and processing (roasting). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2022;105. doi:10.1016/j.jfca.2021.104180
- Albardan L, Platat C, Kalupahana NS. Role of Omega-3 Fatty Acids in Improving Metabolic Dysfunctions in Polycystic Ovary Syndrome. *Nutrients*. 2024;16(17). doi:10.3390/nu16172961
- D. Prabhu Y, Valsala Gopalakrishnan A. Can polyunsaturated fatty acids regulate Polycystic Ovary Syndrome via TGF- β signalling? *Life Sciences*. 2021;276. doi:10.1016/j.lfs.2021.119416
- Zehravi M, Maqbool M, Ara I. Healthy Lifestyle and Dietary Approaches to Treating Polycystic Ovary Syndrome: A Review. *Open Health*. 2022;3(1). doi:10.1515/openhe-2022-0008
- Petrović-Oggiano G, Debeljak-Martačić J, Ranković S, Pokimica B, Mirić A, Glibetić M, Popović T. The effect of walnut consumption on n-3 fatty acid profile of healthy people living in a non-mediterranean west balkan country, a small scale randomized study. *Nutrients*. 2020;12(1). doi:10.3390/nu12010192
- Hajam YA, Rather HA, Neelam, Kumar R, Basheer M, Reshi MS. A review on critical appraisal and pathogenesis of polycystic ovarian syndrome. *Endocrine and Metabolic Science*. 2024;14. doi:10.1016/j.endmts.2024.100162
- Wang J, Zhang K, Sheng J, Ren H, Gong J, Wang Y, Pan D, Wang X, Hao Y. Investigation on Walnut Kernel Oil Extraction Using Different Methods. *BioResources*. 2023;18(1). doi:10.15376/biores.18.1.869-883
- American Oil Chemists' Society. Official Method Ce 2-66: Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids [Official Method] [Internet]. Champaign, IL: AOCS Press; 1997. (Official Methods and Recommended Practices of the AOCS). Official Method Ce 2-66. Elérhető: <https://library.aocs.org/Ce-2-66/2>
- Masoodi L, Gani A, Sircar D, Jan K. Quality analysis of walnut oil extracted by cold press and solvent methods for in vitro phytochemicals, antioxidant activity and GC-MS analysis. *Measurement: Food*. 2025;18:100223. doi:10.1016/j.meafoo.2025.100223
- Laczko-Zöld E, Komlósi A, Ülkei T, Fogarasi E, Croitoru M, Fülöp I, Domokos E, Ștefănescu R, Varga E. Extractability of polyphenols from black currant, red currant and gooseberry and their antioxidant activity. *Acta Biologica Hungarica*. 2018. június;69(2):156-69. doi:10.1556/018.69.2018.2.5
- Council of Europe. European Pharmacopoeia, section 2.3.2. Identification of fatty oils by thin-layer chromatography. 11. kiad. Strasbourg; 2022.
- Iordanescu OA, Radulov I, Buhan IP, Cocan I, Berbecea AA, Popescu I, Posta DS, Camen D, Lalescu D. Physical, nutritional and functional properties of walnuts genotypes (*Juglans regia* L.) from romania. *Agronomy*. 2021;11(6). doi:10.3390/agronomy11061092
- Ahmadi AR, Shirani F, Abiri B, Siavash M, Haghighi S, Akbari M. Impact of omega-3 fatty acids supplementation on the gene expression of peroxisome proliferator activated receptors- γ , α and fibroblast growth factor-21 serum levels in patients with various presentation of metabolic conditions: a GRADE assessed systematic review and dose-response meta-analysis of clinical trials. *Frontiers in Nutrition*. 2023;10. doi:10.3389/fnut.2023.1202688
- Elmore JS, Nisyrrios I, Mottram DS. Analysis of the headspace aroma compounds of walnuts (*Juglans regia* L.). *Flavour Fragr J*. 2005. szeptember;20(5):501-6. doi:10.1002/ffj.1477
- Garcia-Mendoza M del P, Espinosa-Pardo FA, Savoie R, Etchegoyen C, Harscoat-Schiavo C, Subra-Paternault P. Recovery and antioxidant activity of phenolic compounds extracted from walnut press-cake using various methods and

- conditions. *Industrial Crops and Products*. 2021. september;167:113546. doi:10.1016/j.indcrop.2021.113546
26. Zhou X, Gong X, Li X, An N, He J, Zhou X, Zhao C. The Antioxidant Activities In Vitro and In Vivo and Extraction Conditions Optimization of Defatted Walnut Kernel Extract. *Foods*. 2023. september 14.;12(18):3417. doi:10.3390/foods12183417
27. Arcan I, Yemeniciolu A. Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009;22(3). doi:10.1016/j.jfca.2008.10.016
28. Yan S, Wang X, Yang C, Wang J, Wang Y, Wu B, Qiao L, Zhao J, Mohammad P, Zheng X, Xu J, Zhi H, Zheng J. Insights Into Walnut Lipid Metabolism From Metabolome and Transcriptome Analysis. *Frontiers in Genetics*. 2021;12. doi:10.3389/fgene.2021.715731
29. Thiagarajan DK, Basit H, Jeanmonod R. Physiology, Menstrual Cycle. *StatPearls*. 2024

A dió (*Juglans regia*) lipid-összetételének és bioaktív vegyületeinek változásai különböző tárolási körülmények között: jelentőségük a polycystás ovarium szindrómával (PCOS) kapcsolatos jövőbeli kutatások szempontjából

Máté Dalma¹, Vancea Szende², Ferenc Elek², Laczkó-Zöld Eszter³

¹Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológia Egyetem, Táplálkozástudományi Kar, ²Hargita Megyei Törvényszéki Orvostan, Toxikológia laboratórium, Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház, ³Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológia Egyetem, Farmakognózia és Fitoterápia Tanszék

Összefoglaló • A Juglandaceae családba tartozó *Juglans regia* L., azaz a közönséges dió a PUFA-ban gazdag növényi források egyik jelentős képviselője, amely gyógyászati potenciállal rendelkezhet. A dió funkcionális élelmiszerként történő alkalmazásához elengedhetetlen a dió kémiai összetételében bekövetkező változások vizsgálata a tárolási körülmények hatására. Jelen tanulmány célja a *Juglans regia* dióminták lipidprofiljának, összepolifenol tartalmának (TPC), antioxidáns kapacitásának és fitoszterol tartalmának vizsgálata különböző tárolási körülmények és betakarítási évek szerint. A mintákat héjban (WW, Whole Walnut) és héj nélkül (WK, Walnut Kernel) tárolt formában vizsgáltuk. A gázkromatográfiás (GC-MS) vizsgálatok alapján a dióminták zsírsavprofilját a linolsav dominanciája jellemezte. Eredményeink azt mutatták, hogy a tárolási mód és a betakarítási év nem eredményezett számottevő változást a zsírsavösszetételben. A 2024-es begyűjtésből származó diók összepolifenol-tartalma magasabbnak bizonyult a 2025-ös szüret mintáival szemben, illetve a 2-es fa 2024-es termésének esetében a WW minták szignifikánsan magasabb összepolifenol-tartalommal rendelkeztek a WK mintákhoz képest. A dióbél formában tárolt 2025-ös mintákban csökkenés volt megfigyelhető. Az antioxidáns aktivitásban nem volt szignifikáns különbség, bár a 2025-ös minták valamivel alacsonyabb értékeket mutattak. A lipidösszetétel kvalitatív szinten nem mutatott jelentős eltérést, ugyanakkor a vékonyréteg-kromatográfiás profil alapján a fitoszterolok jelenléte valószínűsíthető. Eredményeink alapján a dió lipidösszetétele a vizsgált tárolási körülmények között viszonylag stabil maradt, míg egyes bioaktív komponensek esetében a tárolási mód és a betakarítási év hatása is megfigyelhető volt. A megfigyelt összefüggések klinikai relevanciájának igazolásához további vizsgálatok szükségesek.

Kulcsszavak • *Juglans regia*, többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA), fenolos vegyületek, tárolási körülmények, polycystás ovarium szindróma (PCOS)

DOI: 10.2478/orvtudert-2026-0009

Orvostudományi Értesítő 2026, 99(2): 125–146

Bevezető

A zsírok kulcsszerepet játszanak az emberi egészségben, és a dióféléket kiemelkedő lipidforrásnak tekintik. A *Juglans regia* L., vagyis a közönséges dió, a világ egyik legrégebben termesztett és legelterjedtebb növénye [1]. A Juglandaceae családhhoz tartozik, és angol vagy perzsa diónak is nevezik [2]. A dióban található többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA-k) hozzájárulhatnak a szív- és érrendszer, az anyagcsere, valamint a reprodukció és

idegrendszeri folyamatok homeosztázisának fenntartásához [3,4]. A domináns zsírsav a linolsav (C18:2, n-6), ami körülbelül 50-73%-os arányban fordul elő [5–7]. A legfontosabb omega-3 zsírsav, az alfa-linolénsav (ALA, C18:3, n-3), a teljes zsírtartalom 12-18%-át teszi ki [5]. Ez a gazdag lipidtartalom a diót különösen érzékennyé teszi az oxidációval szemben [2,5,8]. A dióban található bioaktív molekulák és antioxidáns kapacitásuk ezért kulcsfontosságúak a dió minőségének megőrzésében az oxidáció mérséklésén keresztül [1,9,10]. A dióbél hártálya (pellicula) és a belső sövény (septum) mechanikai törése

és eltávolítása után az oxidációval szembeni természetes védőgátak megszűnnek [8,11], ami kiemeli ezen bioaktív anyagok jelentőségét.

A flavonoidok egy kulcsfontosságú polifenolcsoport, amelyet aromás gyűrűs szerkezet jellemez. Gátolják a lipidoxidációt, aktiválják az antioxidáns enzimeket, és gátolják az oxidatív enzimek működését [1]. A diófélék flavonoidtartalma környezeti tényezőktől függ, beleértve a hőmérsékletet, az oxigén jelenlétét [1], valamint a tárolási időt [8]. A koncentrációk tárolás során általában csökkennek, valószínűleg a polifenol oxidáz (PPO) aktivitása miatt. A dió mellett jelentős mennyiségben tartalmaz fenolsavakat, flavonolokat és flavanolokat. Ezek az összetevők hozzájárulnak a dió antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásaihoz, ezáltal növelve biológiai értékét [1,5]. A dióolaj, illetve a diópogácsa teljes fenolos tartalmát gyakran galluszsav-ekvivalensben (GAE) adják meg, amely a fenolos vegyületek mennyiségi meghatározásának gyakori referenciaegysége [1,9].

A diók tokoferol tartalma szintén fontos szerepet játszik a magok védelmében. A *Juglans regia* jelentős mennyiségben tartalmaz γ -tokoferolt, amely növeli az olaj antioxidáns aktivitását és meghosszabbítja annak eltarthatóságát [2]. Az α -tokoferol a legreaktívabb és legkevésbé stabil a tokoferolok közül. Feltételezik, hogy az oxidáció gátlása érdekében elsőként ez a forma mobilizálódik [5].

A dió fitoszterol tartalma további előnyt jelent az olajos magvak fogyasztása szempontjából. A fitoszterolok szerkezete hasonló a koleszterinéhez, és a felszívódás során kompetícióba lépnek a táplálékból származó koleszterinnel, ami potenciálisan csökkentheti az alacsony sűrűségű lipoprotein-koleszterin (LDL-koleszterin) szintet. A diófélékben a β -szitoszterol, az $\Delta 5$ -avenoszterol és a kaempeszterol a fő képviselők. Szintjük csökkenhet hőkezelés és oxidatív folyamatok során [2].

A PUFA-k gyulladáscsökkentő és anyagcsere-szabályozó hatásai révén hozzájárulhatnak a menstruációs rendellenességek, valamint az inzulinrezisztencia kezeléséhez [12–14]. Az ALA jelentős mennyiségben megtalálható a dióban, azonban további klinikai vizsgálatok szükségesek annak megerősítésére, hogy a dió funkcionális élelmiszerként alkalmazható-e a reproduktív és menstruációs zavarok kezelésében [12,13,15]. A krónikus gyulladás és az oxidatív stressz kölcsönösen erősíthetik egymást anyagcsere- és reproduktív rendellenességek esetén. A reaktív oxigénfajták (ROS) elősegíthetik a lipid-peroxidációt és kedvezőtlenül befolyásolhatják a

szteroidogenezist [16]. Ezért az étrendi antioxidánsok és a többszörösen telítetlen zsírsavak szerepe egyre nagyobb figyelmet kap [12,14].

Jelen tanulmány célja a *Juglans regia* minták zsírprofiljának, összes fenoltartalmának, antioxidáns kapacitásának és fitoszterol tartalmának összehasonlítása különböző betakarítási évek szerint, valamint eltérő tárolási körülmények mellett. Feltételeztük, hogy a hosszabb ideig, vagy héj nélküli formában tárolt diók kedvezőtlenebb oxidatív és bioaktív paramétereket mutatnak. Mivel a dió bioaktív komponensei potenciálisan szerepet játszhatnak a reproduktív és metabolikus egészség támogatásában, a dió funkcionális élelmiszerként való alkalmazásának vizsgálata a női cikluszavarok – például polycystás ovarium szindrómához (PCOS), illetve újabb elnevezése szerint poliendokrin metabolikus ovárium szindrómához (PMOS) társuló amenorrhoea – szempontjából is releváns lehet. Ehhez először fontos megérteni, hogyan változik a diók zsír- és bioaktív-profilja különböző tényezők hatására.

Anyag és módszer

Mintagyűjtés és tárolás

Diómintákat (*Juglans regia* L.) gyűjtöttünk két különböző fáról (1. és 2. számú fa) a Hargita megyei Bágy (Bădeni) faluban, Romániában (46°13.04.0. N, 25°20.51.0. E). A mintákhoz rendelt azonosító kódokat, a betakarítási évet valamint a tárolás módját az 1. táblázat összesíti. A bizonylati minták a „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem (Marosvásárhely, Románia) Farmakognózia és Fitoterápia Tanszékén kerültek megőrzésre. A mintákat két betakarítási évből nyertük: 2024-ből és 2025-ből.

A 2024-es betakarításból származó WW mintákat körülbelül egy évig szobahőmérsékleten tároltuk. 2025 júniusában ezeknek a dióknak egy részét kézzel feltörtük, és a nyert WK mintákat, további négy hónapig tároltuk az elemzésig. A 2025-ös betakarítású diók röviddel a feltörés után kerültek elemzésre, kizárólag WK formában.

A diókat kézzel törtük fel, hagyományos mechanikai módszerrel, hogy megőrizzük a dióbél épségét. Az olaj kinyerése előtt a magokat egy laboratóriumi darálóval őröltük meg. Az őrlést közvetlenül az olaj kinyerése előtt végeztük, hogy minimalizáljuk az oxidatív változásokat. Minden egyes kivonás során 20 g őrölt mintát mértünk ki ($\pm 0,008$ g). A mintákat biológiai duplikátumban ele-

1. táblázat. A dióminták azonosítása betakarítási év, faeredet és tárolási körülmények szerint

Minta	Azonosító kód	Származási fa	Begyűjtési év	Tárolási forma
Minta 1	AS/0109/2024	1	2024	WW
Minta 2	AS/0109/2024	1	2024	WW
Minta 3	AS/0209/2024	2	2024	WW
Minta 4	AS/0209/2024	2	2024	WW
Minta 5	AS/0109/2024	1	2024	WK
Minta 6	AS/0109/2024	1	2024	WK
Minta 7	AS/0209/2024	2	2024	WK
Minta 8	AS/0209/2024	2	2024	WK
Minta 9	AS/0110/2025	1	2025	WK
Minta 10	AS/0210/2025	2	2025	WK

WW – Whole Walnut (egész dió), WK – Walnut Kernel (dióbél)

meztük. Két 2025-ös dióminta esetében azonban az első sorozat mintáit elégtelen száradás miatt ki kellett zárni a vizsgálatból, ezért ezeknél csak a második sorozatból származó minták kerültek feldolgozásra. A kizárt minták adatai nem jelennek meg az **1. táblázatban**.

Reagensok és referencia anyagok

A kivonásához használt petrol étert Chimreactiv SRL-től (Románia) és az etanolt (96%) a SC ELI CHEMTRADE SRL-től (Románia) szereztük be. A különböző elválasztásoknál használt HPLC tisztaságú metanolt a Fisher Scientific (Loughborough, Egyesült Királyság), míg a n-hexánt (HPLC grade), nátrium-hidroxidot ($\geq 99\%$) és Folin–Ciocalteu reagenst a Carl Roth GmbH Co. (Karlsruhe, Németország) forgalmazta. A galluszsavat, a 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilt (DPPH), foszfor-molibdén-savat, rodamin, valamint a toluolt (HPLC tisztaságú) a Sigma-Aldrich (Németország) cégtől szereztük be. Vízmentes nátrium-karbonátot a Labkem (Barcelona, Spanyolország), diklórmetánt a Honeywell Riedel-de Haën GmbH (Németország), petrolétert és dietil-étert pedig a Merck-től (Darmstadt, Németország), jégecet a Silal Trading SRL (Románia), valamint acetont a SC Mobil Dacami Impex SRL (Románia) cégektől használtunk.

A GC vizsgálatnál használt α -tokoferol, α -linolénsav, linolsav és palmitinsav standardokat a MedChemExpress (AEÁ) cégtől szereztük be.

Zsíros olaj kivonása

A zsíros olaj kivonását Soxhlet készülékkel végeztük el a Wang et al. [17] által leírt protokoll szerint. Petrol étert használtunk oldószerként 76 °C-on 4 órán keresztül, 1:7

szilárd-oldószer arány mellett (20 g minta 140 mL oldószerhez). Az extrakciót követően az oldószert egy rotációs vákuumbepárlón (Janke & Kunkel IKA Labortechnik RV 05-ST) eltávolítottuk. Az olajtartalom százalékos kiszámítása a következőképpen történt:

$$\text{Olajtartalom (\%)} = (\text{kinyert olaj tömege} / \text{kezdeti száraz mag tömege}) \times 100$$

Az extrahált olajokat a további elemzésekig 4 °C-on tároltuk. A visszamaradt zsírtalanított diópogácsát eltávolítottuk az extrakciós hüvelyből, megszáritottuk, majd 4 °C-on tároltuk a további vizsgálatokig.

Dióolaj zsírsav összetételének vizsgálata

A dióolaj lipid-összetételének elemzéséhez zsírsav metilésztereket (FAME) képeztünk az AOCS (American Oil Chemists' Society, Amerikai Olajkémikusok Társasága) hivatalos módszere szerint [18]. 100 mg dióolaj mintát 2 mL n-hexánban oldottuk fel, amelyet 0,2 mL 2M NaOH metanolos oldattal 60 másodpercig homogenizáltuk, majd 20 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az így nyert mintákat 100-szoros hígításban vizsgáltuk. Az elválasztást HP-5MS UI kapilláris oszlopon (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μ m) végeztük Agilent 7890B gázkromatográfól és Agilent 5977A MSD tömegspektrofotométerből álló rendszeren Masoodi módosított módszere [19] alapján. Héliumot használtunk hordozógázként, 1 mL/min áramlási sebességgel. Az injektálás splitless módban történt, 1 μ L injektált térfogattal, 250 °C injektor hőmérsékleten. A kemence hőmérséklet-programja 60 °C-on indult (1 perc), majd 10 °C/perc sebességgel 250 °C-ig emelkedett, ahol 5 perc hőntartást alkalmaztunk. A tömeg-

spektrométer elektronionizációs (EI) módban működött 70 eV ionizációs energiával. Az ionforrás és kvadrupól hőmérséklete rendre 230 °C, illetve 150 °C volt. A tömegspektrumok felvétele 40–500 m/z tartományban történt.

A zsírsav-metilészterek (FAME) azonosítását a rögzített tömegspektrumok és a NIST 14, valamint az MPW 5e könyvtárakban található referencia-spektrumok összehasonlításával végeztük. A vizsgált mintákban a zsírsavak relatív arányát a csúcsfelület-százalékos módszerrel becsültük meg. E módszerben az összes kimutatott csúcs teljes felületét 100%-nak vesszük, a célvegyület csúcsának felületét pedig a teljes felület arányaként fejezzük ki.

Szabad zsírsavak és illóanyagok vizsgálata

A dióolajban és az olaj nyérésekor visszamaradt pogácsában található szabad zsírsavak, valamint az illóanyagok azonosítására a fent leírt GC-MS módszert alkalmaztuk. Ehhez 0,050 g dióolajat 1 mL n-hexánban oldottunk, majd további 10-szeres hígítást végeztünk. A diópogácsa etanolos kivonatainál további hígítást nem alkalmaztunk. A vegyületek azonosítása a retenciós idők (Rt) és a tömegspektrumok alapján, a NIST tömegspektrum-adatbázis segítségével történt (85 feletti egyezési minőséggel rendelkező vegyületeket vettük figyelembe).

A dióolaj antioxidáns aktivitásának meghatározása DPPH módszerrel

A dióolaj minták szabadgyökfogó kapacitását a 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) teszt segítségével értékeltük, egy zsíros olajokra adaptált módszer alkalmazásával [2]. 1 mM koncentrációjú DPPH törzsoldatot készítettünk toluolban. Ezt követően a munkaoldatot toluollal való tízszeres hígítással nyertük (0,1 mM). Zsíros-olaj mintákat (0,100 g ± 0,003 g) 1 mL toluolban oldottunk fel, és 30 másodpercig ráztuk (Tube Revolver, Thermo Scientific, USA) a homogenizálás érdekében. Ezt követően 2900 µL 0,1 mM DPPH reagens oldatot adtunk hozzá. A reakciós keveréket sötétben, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, ezt követően az abszorbanciát 517 nm-nél mértük.

Negatív kontrollokat készítettünk minden analitikai sorozathoz az olajmintát toluollal helyettesítve. A gátlási százalékot külön-külön számítottuk ki minden sorozatra a következő képlettel:

$$\%RSA = [(A_{\text{kontroll}} - A_{\text{minta}}) / A_{\text{kontroll}}] \times 100$$

ahol A_{kontroll} a negatív kontroll abszorbanciája, A_{minta} pedig a tesztelt olajmintáé.

A diópogácsák antioxidáns aktivitásának meghatározása DPPH módszerrel

A diópogácsák etanolos kivonatának antioxidáns aktivitását DPPH módszerrel határoztuk meg [1], metanolos DPPH oldat alkalmazásával. A mérés során 100 µL etanolos kivonathoz 1500 µL 0,1 mM koncentrációjú DPPH oldatot adtunk. A reakciókeveréket 15 percig, szobahőmérsékleten és sötétben való inkubálást követően értékeltük, 517 nm-en mértük az abszorbanciát UV/VIS spektrofotométerrel. Kontrollként a DPPH oldat abszorbanciáját használtuk. Az antioxidáns aktivitást a DPPH gyökkötő kapacitás (%) kiszámításával határoztuk meg:

$$\%Gátlás = [(A_{\text{kontroll}} - A_{\text{minta}}) / A_{\text{kontroll}}] \times 100$$

ahol A_{kontroll} a DPPH oldat abszorbanciája, az A_{minta} pedig a kivonatot tartalmazó reakciókeverék abszorbanciája.

A diópogácsa összpolicifol-tartalmának (TPC) meghatározása

A zsírtalanított diópogácsa összpolicifol-tartalmát a Folin–Ciocalteu módszerrel határoztuk meg [20]. A 0,2 g zsírtalanított diópogácsát 10 mL etanollal 15 percig extraháltuk ultrahang-fürdőben. A kivonatot centrifugáltuk, majd a maradékot ismételt kivontuk azonos körülmények között. Az egyesített felülúszókat használtuk a meghatározáshoz. 40 µL kivonathoz 3,16 mL desztillált vizet és 200 µL Folin–Ciocalteu reagenst adtunk, majd 30 másodperc keverést és 8 perc inkubálást követően 600 µL 20%-os nátrium-karbonát-oldatot adagoltunk. A mintákat 2 órán át sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az abszorbanciát 765 nm-nél mértük egy UV/VIS (JK-UVS-752 N) spektrofotométer segítségével. A minták összpolicifol-tartalmát galluszsav ekvivalensben fejeztük ki, a galluszsav referencia oldat segítségével.

A kalibrációs görbét 50–400 mg/L koncentráció-tartományú galluszsav standard oldatok felhasználásával készítettük. A policifolok mennyiségét a regressziós egyenlet ($x=y+0,0194/0,0012$. $R^2 = 0,9955$) segítségével számítottuk ki, galluszsav-ekvivalensben kifejezve, a száraz tömegre vonatkoztatva (mg GAE/g DW).

$$\text{mg GAE/g} = (C \times V) / m$$

ahol C a kalibrációs görbéből kapott koncentráció (mg/L), V a kivonási térfogat (0,02 L), és m a minta tömege.

Vékonyréteg kromatográfia (VRK) elemzés a dióolajok esetében

Vékonyréteg kromatográfias vizsgálatot alkalmaztunk a dióolajminták lipid-összetételének kvalitatív értékelésére, a Európai Gyógyszerkönyv (Ph.Eur.) 11. kiadása szerint [21]. Az egyes olajmintákból 20 mg-ot 1–1,5 mL metilén-kloridban oldottunk fel az alkalmazás előtt. Összehasonlítás képpen olívaolajat, β -szitoszterol és sztigmaszterol referencia anyagokat használtunk (20 mg/mL, metilén-kloridban oldva).

A kromatográfias elválasztásokat normál fázisú szilikagél lemezek (ALUGRAM® SIL G/UV254, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország), valamint fordított fázisú lemezek (RP-18, F254S, 0,25 mm, Merck, Darmstadt, Németország) végeztük. A normál fázisú elválasztásnál petrol-étert, valamint petrol-éter – dietil-éter – jégcet (23,5:5:1,5, v/v/v) keveréket használtunk. A fordított fázisú lemezeket metilén-klorid – jégcet – acetone (20:40:50, v/v/v) eleggyel fejlesztettük ki.

A kifejlesztést követően a lemezeket levegőn megszáritottuk, majd a komponenseket foszfor-molibdén-savas előhívással (120 °C-on 3 percig történő hevítéssel), illetve rodaminos előhívással, 365 nm-es UV-fényben vizualizáltuk (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Franciaország). A lipidkomponensek azonosítása a retenciós viselkedés (R_f értékek), valamint a referencia olajokkal és fitoszterol-standardokkal való összehasonlítás alapján történt.

Statisztikai értékelés

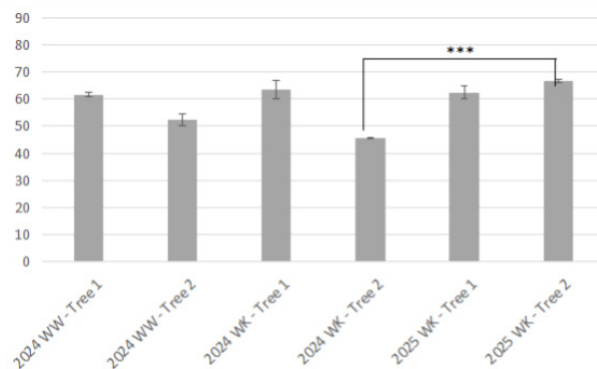
Az eredményeket átlag $\pm$ szórás (SD) formájában fejeztük ki. A csoportok közötti különbségek statisztikai értékelését kétmintás Welch-féle t-próbával végeztük a Microsoft Excel program segítségével. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

A zsírsavprofil statisztikai feldolgozása során a nem detektálható (n.d.) értékeket a biológiai duplikátumban mért értékekkel helyettesítettük, kivéve azokat az eseteket, amikor a komponens egyik ismételtsében sem volt detektálható.

Eredmények

Olajhozam

A dióminták olajtartalmát az **1. ábra** mutatja be. A 2024-ben gyűjtött minták esetén a 2-es fa alacsonyabb olajtartalmat mutat az 1-es fához képest, úgy a WW mint a WK minták esetén, azonban ezek a különbségek nem voltak



1. ábra. A különböző fákról származó dióminták olajtartalma (%) betakarítási év és tárolási forma szerint csoportosítva. Az értékek az átlag $\pm$ szórás (SD) formában vannak megadva. WW – Whole Walnut, WK – Walnut Kernel (dióbél). *** $p \leq 0,001$

statisztikailag szignifikánsak ($p = 0,08$ és $p = 0,07$). A WK minták közül, a 2-es fa esetén statisztikailag jelentős különbség volt megfigyelhető meg a 2024 és 2025-ös évek között ($p \leq 0,001$), amint azt az 1. ábra is mutatja. A két évből származó WK minták olajtartalma közötti különbség 10,37% volt.

A dióolajok zsírsav-összetétele

A GC-MS analízis során vizsgált dióolajminták lipid-összetételében elsősorban a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) domináltak (**2. táblázat**). A legnagyobb arányt a linolsav (C18:2) mutatta, ezt követte a palmitinsav (C16:0), majd a sztearinsav (C18:0). Az α -linolénsav (C18:3) több mintában is jelentős mennyiségben volt jelen, ugyanakkor a meghatározott azonosítási kritériumok (Qual >85) mellett néhány mintában nem volt kimutatható. Hasonló jelenség volt megfigyelhető a C18:1 zsírsavak esetében is, azonban a statisztikai feldolgozás során a hiányzó értékeket a megfelelő biológiai duplikátumban mért értékekkel helyettesítettük. Az eikozénsav (C20:1) valamennyi mintában csak kis mennyiségben fordult elő.

A minták zsírsavprofiljának összehasonlítása során a legtöbb vizsgált komponens esetében nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget. Ugyanakkor a sztearinsav (C18:0) arányában szignifikáns eltérés mutatkozott a 2024-es WW minták esetében a két vizsgált fa között ($p = 0,046$), valamint az 1-es számú fa ugyanazon évből származó WW és WK mintái között ($p = 0,016$). A további statisztikailag szignifikáns eredmények olyan összehasonlításokból származtak, amelyek esetében nem

2. táblázat. A tárolási körülmények hatása a dióolaj zsírsav-összetételére. Az eredmények átlag $\pm$ szórás formában vannak megadva

Zsírsav (%)	2024 WW – Tree 1	2024 WW – Tree 2	2024 WK – Tree 1	2024 WK – Tree 2	2025 WK – Tree 1	2025 WK – Tree 2
C16: 0	13,34 $\pm$ 0,31	14,05 $\pm$ 0,03	13,58 $\pm$ 0,31	15,27 $\pm$ 1,11	14,90 $\pm$ 0,00	15,90 $\pm$ 0,00
C18: 0	5,31 $\pm$ 0,04	5,06 $\pm$ 0,02	4,87 $\pm$ 0,03	5,28 $\pm$ 0,24	5,32 $\pm$ 0,00	5,25 $\pm$ 0,00
C18: 1	11,42 $\pm$ 0,00	17,24 $\pm$ 2,09	17,92 $\pm$ 0,00	8,56 $\pm$ 0,00	15,99 $\pm$ 0,00	15,12 $\pm$ 0,00
C18: 2	55,85 $\pm$ 0,93	56,81 $\pm$ 1,96	55,13 $\pm$ 1,23	56,57 $\pm$ 1,34	57,94 $\pm$ 0,00	57,62 $\pm$ 0,00
C18: 3	13,01 $\pm$ 5,67	n.d.	19,20 $\pm$ 0,00	11,63 $\pm$ 5,85	n.d.	n.d.
C20: 1	0,62 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,08	0,63 $\pm$ 0,00	0,61 $\pm$ 0,00
SFA	18,65 $\pm$ 0,27	19,10 $\pm$ 0,00	18,45 $\pm$ 0,28	20,54 $\pm$ 1,34	20,22 $\pm$ 0,00	21,15 $\pm$ 0,00
MUFA	12,04 $\pm$ 0,07	17,77 $\pm$ 2,01	18,51 $\pm$ 0,03	9,18 $\pm$ 0,08	16,62 $\pm$ 0,00	15,73 $\pm$ 0,00
PUFA	68,85 $\pm$ 4,74	56,81 $\pm$ 1,96	74,33 $\pm$ 1,23	68,19 $\pm$ 7,18	57,94 $\pm$ 0,00	57,62 $\pm$ 0,00

detektált értékek helyettesítésére is sor került.

Tokoferolok és egyéb bioaktív komponensek

A GC-MS analízis során több zsírdékony bioaktív vegyület jelenlétét figyeltük meg a dióolaj-mintákban. A konzisztensen előforduló komponenseket a **3. táblázat** szemlélteti.

A γ -tokoferol minden vizsgált mintában azonosítható volt, míg a szkvalén jelenlétét tíz vizsgált mintából öt esetben tudtuk kimutatni. A minták mindegyikében megtalálható volt a 2,4-di-tert-butilfenol is. Mivel a vegyület eredete nem állapítható meg egyértelműen a jelen vizsgálat alapján, a biológiai jelentőségét nem értelmeztük.

A kezeletlen dióolaj és a diópogácsa-minták illókomponensei, és szabad zsírsavak

A hexánnal hígított dióolajmintákban kizárólag a D-limonene volt egyértelműen azonosítható, ez az illókomponens minden mintában jelen volt.

A diópogácsa etanolos kivonataiban hat aromaanyag jelenlétét azonosítottuk (**4. táblázat**). A leggyakrabban előforduló komponensnek a 5-metilheptán-3-ol és a D-limonén bizonyultak. A 3-oktanon csupán két mintában volt kimutatható, míg az o-cimén, eukaliptol, γ -terpinén és kámfor előfordulása csak egyes mintákban jelent

meg.

A diópogácsa-mintákban az aromaanyagok mellett kis mennyiségben szabad zsírsavakat is azonosítottunk, elsősorban linolsav (C18:2) és palmitinsav (C16:0) formájában.

A dióolaj antioxidáns aktivitása

A dióolajminták szabadgyök-elnyelő aktivitását DPPH-tesztel határoztuk meg, és az eredményeket százalékos gátlás formájában adtuk meg.

A dióolajminták DPPH szabadgyök-elnyelő aktivitása 10,00 $\pm$ 0,91% és 19,36 $\pm$ 10,31% közötti értékeket mutatott. A 2024-es WW és WK minták átlagos gátlása rendre 17,75 $\pm$ 9,43% és 19,36 $\pm$ 10,31% volt, míg a 2025-ös WK minták alacsonyabb átlagos aktivitást mutattak (10,00 $\pm$ 0,91%). A csoportok közötti különbségek azonban nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak sem a tárolási mód ($p = 0,848$), sem a betakarítási év ($p = 0,214$) tekintetében. A két vizsgált fa között szintén nem mutatkozott szignifikáns eltérés ($p = 0,980$). A minták esetében jelentős szórás volt megfigyelhető, különösen a 2024-es mintacsoportokban.

A diópogácsák antioxidáns aktivitása

A diópogácsa etanolos kivonatának antioxidáns akti-

3. táblázat. A dióolaj-mintákban azonosított γ -tokoferol és szkvalén előfordulása

Tokoferolok és bioaktív vegyületek	RT (min)	2024 WW – Tree 1	2024 WW – Tree 2	2024 WK – Tree 1	2024 WK – Tree 2	2025 WK – Tree 1	2025 WK – Tree 2
Szkvalén	26.658	+	+	$\pm$	–	–	–
γ -Tokoferol	28.334	+	+	+	+	+	+

RT – Retention time (retenció idő), „+” = jelen van, „ $\pm$ ” = az egyik mintában jelen van, „–” = nem detektálható.

4. táblázat. A dióminták illókomponenseinek változása a tárolási körülmények szerint

Minta-csoport	RT (min)	Aroma-komponens	2024 WW - Tree 1	2024 WW - Tree 2	2024 WK - Tree 1	2024 WK - Tree 2	2025 WK - Tree 1	2025 WK - Tree 2
Hexánban oldott dióolaj-minták	5,427	D-limonén	+	+	+	+	+	+
Diópogácsa etanolos kivonatai	4,351	3-oktanon	±	-	-	-	-	+
	4,427	5-metilheptán-3-ol	±	+	+	+	+	-
	5,456	D-limonén	+	+	±	±	+	+
	5,522	o-cimén	-	±	-	-	-	-
	5,622	eukaliptol	-	±	±	±	+	-
	5,972	γ-terpinén	-	-	±	-	-	-
	7,267	kámfor	-	±	-	±	-	-

RT – Retention time (retenciós idő), „+” = jelen van, „±” = az egyik mintában jelen van, „-” = nem detektálható.

vitását DPPH-tesztel határoztuk meg, és a DPPH gátlás százalékos értékében fejeztük ki. Az antioxidáns aktivitás a vizsgált mintákban $70,26 \pm 1,82\%$ és $90,59 \pm 1,06\%$ közötti tartományban mozgott. A statisztikai összehasonlítás azonban nem mutatott szignifikáns különbséget a 2024-es WW és WK minták között, sem a 2024-es és 2025-ös WK minták között. A két vizsgált fa között sem volt statisztikailag szignifikáns különbség az antioxidáns aktivitásban. Az eredményeket a **2. ábra** szemlélteti.

Összpolifenol-tartalom a diópogácsában

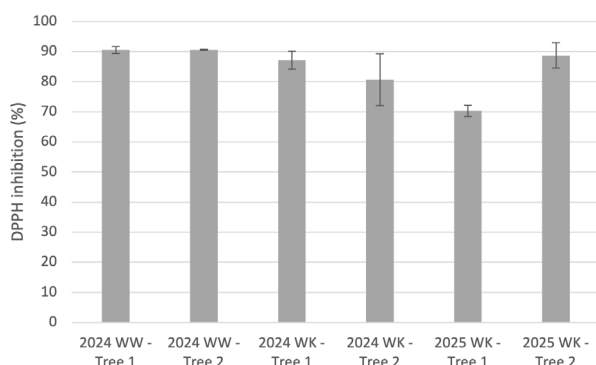
A diópogácsa minták összpolifenol-tartalmát (TPC) a Folin–Ciocalteu módszerrel határoztuk meg, és az eredményeket mg galluszsav-ekvivalens/g száraz tömeg (mg

GAE/g DW) egységben fejeztük ki. Az egyedi mérések alapján a TPC-értékek 6,28 és 62,28 mg GAE/g DW között mozogtak (**3. ábra**).

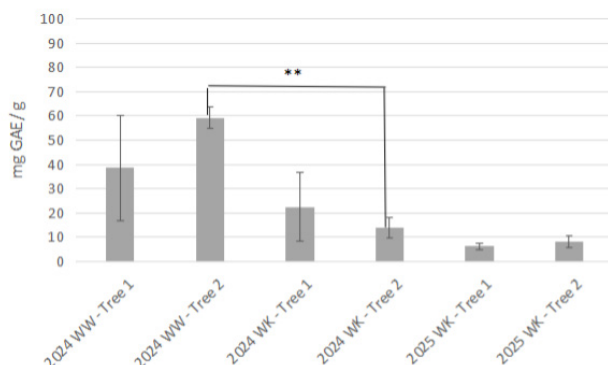
A statisztikai elemzés jelentős különbséget mutatott ki a 2024-es betakarítású WW és WK minták között, különösen a 2. fáról származó diók esetén ($p = 0,008$). A 2025-ös WK mintáknál születtek a legalacsonyabb TPC értékek ($6,28 \pm 1,2$ mg GAE/g). Bár a 2024-es WK mintákhoz képest csökkenést figyeltünk meg, a különbség nem volt szignifikáns ($p > 0,2$).

Dióolajok vékonyréteg kromatográfiás vizsgálata

A GC analízist megelőzően vékonyréteg-kromatográfiás (VRK) elemzést végeztünk az extrakciós sorozatból származó dióolajmintákon a lipid-összetétel minő-



2. ábra. A diópogácsa etanolos kivonatának DPPH szabadgyök-gátló aktivitása (%). Az értékek átlag $\pm$ szórás (SD) formában vannak megadva. WW – Whole Walnut (egész dió), WK – Walnut Kernel (dióbél).



3. ábra. A diópogácsa összpolifenol-tartalma (mg GAE/g DW). Az értékek az átlag $\pm$ szórás (SD) formában vannak megjelenítve. GAE – Gallic Acid Equivalents (Galluszsav-egyenérték), WW – Whole Walnut (egész dió), WK – Walnut Kernel (dióbél). ** $p < 0,05$

ségi értékelése érdekében, a Ph.Eur. módszere szerint. Összességében elmondható, hogy különböző dióolaj-minták kromatográfiás profilja hasonlóan bizonyult, a sávok elhelyezkedése és intenzitása csak kisebb eltéréseket mutatott. A VRK eredmények részletes bemutatása a kiegészítő anyagban érhető el.

Megbeszélés

A szakirodalom alapján a *Juglans regia* L. – dió - diétás vagy kutatási célú alkalmazását leggyakrabban a mag (gyümölcs) kedvező zsírsírfilja indokolja. A dió körülbelül 52–70%-át zsírok teszik ki [2,5], és ezeknek a lipideknek a minőségét számos bioaktív komponens javítja. Jelen tanulmány vizsgálta a diók olajtartalmát, amely a Soxhlet kivonás után nem mutatott jelentős eltéréseket a dióminták csoportjai között a gyűjtési év (2024 vs. 2025) vagy a tárolási módszer (WK vs. WW) alapján. A vizsgálatban kivonásnak alávetett összes dió átlagos olajtartalma 57,53% volt, ami közel áll a Wang et al. [17] által elért Soxhlet kivonási módszer hatékonyságához (58,29%). A kivonási hatékonyságot befolyásoló tényezők közé tartozik a fajok közötti variabilitás [22] és a kivonási módszer [17]. Iordanescu és mtsai. [22] több mint 10%-os eltérést figyeltek meg különböző genotípusú romániai dióminták zsírtartalmában. Hasonló eredményt kaptunk a mi tanulmányunkban is, amely alátámasztja a két fa gyümölcse közötti különbséget.

A vizsgált dióminták zsírsavösszetétele a *Juglans regia* fajra jellemző mintázatot követte, amelyet a többszörösen telítetlen zsírsavak dominanciája jellemez [5,7]. A PUFA-frakción belül a linolsav bizonyult a meghatározó komponensnek, amely a szakirodalmi adatokhoz hasonlóan a dióminták zsírsav-tartalmának több mint felét képviselte [7,22].

Az ALA egyes mintáknál nem volt detektálható, ami korlátozza a zsírsavprofil értékelését. Ahol azonban jelen volt (2024 WW – Tree 1 valamint 2024 WK – Tree 1 és Tree 2), koncentrációja összhangban állt a szakirodalomban közölt korábbi értékekkel (12–18%) [2,5], bár egyes esetekben alacsonyabb értékeket mutatott. Mivel az ALA jelenlétét különböző genotípusokban és eltérő tárolási körülmények mellett végzett vizsgálatok egyaránt igazolták [2,5,22], ezért valószínűsíthető, hogy az egyes mintákban tapasztalt nem detektálható értékek háttérben módszertani vagy azonosítási korlátok állhatnak.

A sztearinsav esetében statisztikailag szignifikáns

különbséget figyeltünk meg ($p = 0,04$) a 2024-es WW mintákban a két fa termése között. Ennek háttérében feltehetően genotípusbeli különbségek állnak. Iordanescu és mtsai [22] vizsgálatában a sztearinsav-tartalom 3,28–6,50% közötti értékeket jegyeztek fel, ami a jelen vizsgálatban tapasztalt eltéréseknél is nagyobb variabilitást jelez.

Eredményeink alapján sem a tárolási mód, sem a vizsgált betakarítási év nem befolyásolta számottevően a zsírsavprofil alapvető szerkezetét. Várakozásunkkal ellentétben nem figyeltünk meg olyan tendenciát, amely szerint a héjban tárolt diók kedvezőbb zsírsavösszetétellel rendelkeztek volna, illetve a frissebb minták sem mutattak következetesen eltérő profilt. Hasonló megfigyelésekről számoltak be korábbi tárolási hatást vizsgáló munkák is, amelyek szerint az oxidációs folyamatok előrehaladtával először az antioxidáns komponensek, az oxidációs markerek és az érzékszervi tulajdonságok változnak, míg a zsírsavösszetétel hosszabb ideig megőrizheti stabilitását [5,8].

A PUFA-ban gazdag táplálékok fogyasztása élettani szempontból kiemelkedő jelentőséggel bír. Az omega-6 és omega-3 zsírsavak megfelelő aránya elősegítheti a gyulladásos folyamatok szabályozását és a metabolikus egészség fenntartását [12,23]. Jelen tanulmány esetén az ALA jelenlétére vonatkozó eredmények inkonzisztensek, ezért az omega-6/omega-3 arány nem ítélt meg minden mintára nézve. Azokban a mintacsoportokban, ahol az ALA jelen volt, a dió az esszenciális omega-3 zsírsavaknak potenciálisan kedvezőbb forrását jelentheti. Az ALA tényleges élettani jelentőségének megítélését viszont nehezíti, hogy az emberi szervezetben az EPA-vá és DHA-vá történő átalakulás határfoka korlátozott [15].

Magas PUFA-tartalma miatt a dió fokozottan érzékeny a lipidoxidációra, amelynek során számos illékony vegyület képződhet [5]. A hexánban oldott dióolajminták, valamint a diópogácsa etanolos kivonatainak vizsgálata során azonban nem azonosítottunk jelentős mennyiségben olyan, a dió avasodásával gyakran összefüggésbe hozott aldehideket vagy egyéb oxidációs markereket, amelyek előrehaladott lipidoxidációra utalnának.

A minták illóanyagai között elsősorban terpén jellegű komponensek voltak jelen. A kezeletlen dióolajokban a D-limonén, míg a diópogácsa etanolos kivonataiban a D-limonén mellett az o-cimén, eukaliptol, γ -terpinén és kámfor jelentek meg. A kimutatott vegyületek a dió természetes illóanyag-frakciójának részét képezik [24].

Az etanolos kivonatokban a szabad zsírsavak jelenlétét is vizsgáltuk. Ezek közül csupán a linolsav (C18:2) és a

palmitinsav (C16:0) volt kimutatható, viszonylag alacsony mennyiségben.

A dióolajminták antioxidáns aktivitásában nem figyeltünk meg statisztikailag szignifikáns különbséget sem a betakarítási év, sem a tárolási mód szerint, ugyanakkor a 2025-ös minták átlagos DPPH-gátlása alacsonyabbnak bizonyult. Az eredmények értékelését jelentős mértékben korlátozza a 2024-es mintáknál tapasztalt nagy szórás. A GC-MS vizsgálatok alapján a zsírsavprofil alapvető szerkezete stabil maradt, jelentős mennyiségű oxidációs marker pedig nem volt kimutatható, amivel összhangban állnak a DPPH-teszt eredményei is. A toluol alkalmazása elősegíti ugyan az olaj oldását, azonban hozzájárulhat a mérési variabilitásához, ami részben magyarázhatja a kapott eredmények nagy szórását, így a vizsgálat eredményei csak korlátozottan értelmezhetők.

A diópogácsából készült etanolos kivonatokra alkalmazott DPPH-teszt kis különbségeket mutatott a különböző gyűjtési évből származó, valamint héjban vagy héjtalan állapotban tárolt dióminták között (2. ábra). A várakozásnak megfelelően a dióhéjban megőrzött magvak magasabb antioxidáns aktivitást mutattak (2. fa: $90,59 \pm 0,17\%$), mint a héjtól elválasztott dióbél minták (2. fa: $80,63 \pm 8,57\%$). Bár a 2024-es WW minták magasabb antioxidáns aktivitást mutattak, a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns, ami valószínűleg a korlátozott biológiai replikaszámnak tulajdonítható. Garcia-Mendoza et al. [25] kimutatták, hogy a fenolos vegyületek mennyisége szorosan összefügg a DPPH aktivitással, ami jelen vizsgálat eredményeivel is összhangban áll. A dió préselése során visszamaradó pogácsában jelentős mennyiségben halmozódnak fel fenolos vegyületek, ami magyarázatot adhat a diópogácsából készült etanolos kivonatok erőteljesebb DPPH-gátló aktivitására. Hasonló megfigyelésekről számoltak be Zhou et al. [26], akik zsírtalanított diókivonatok antioxidáns aktivitását vizsgálták, többek között DPPH módszerrel. Jelentős szabadgyök-gátló hatást tapasztaltak a fenolos vegyületekben gazdag frakciókban. A diópogácsa-kivonatok magasabb antioxidáns aktivitása és TPC-eredmények közötti összefüggés arra utal, hogy a fenolos vegyületek jelentősen hozzájárulhatnak a megfigyelt szabadgyök-gátló hatáshoz.

Megvizsgáltuk a zsírtalanított diópogácsa összes fenoltartalmát, amelyet Soxhlet extrakcióval nyertünk. A tárolási módszer jelentős hatással volt a fenoltartalomra, melynek legvalószínűbb oka a dióhéjban és a septumban található védő bioaktív komponensek jelenléte. A dióhéj és a kapcsolódó szövetrészek fenolos vegyületekben gaz-

dag, természetes védőréteget képeznek, amely mérsékelheti az oxidatív folyamatokat [8,11]. A fenolos tartalom megőrzése érdekében előnyös tárolási módszerek közé tartozik a hűtés, a módosított légköri csomagolás és a héjban való tárolás [1,10].

A diófenolok flavanoloikat, flavonoloikat és fenolsavakat tartalmaznak, amelyek antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásaik révén hozzájárulnak a dió biológiai értékéhez [1,5]. Csökkenő tendencia figyelhető meg a fenolos tartalomban ($p = 0,109$) a dió érési folyamatának előrehaladtával. A 2025-ös gyűjtésből származó 1-es fa diómintáinak összes fenolos tartalma $6,28 \pm 1,2$ mg GAE/g, ami jelen tanulmány legkisebb TPC eredményeit produkálta. Az eredményeket befolyásolhatta a biológiai replikák korlátozott száma. Cui M et al. [9] tanulmányában hasonló folyamatot figyeltek meg. A szabad galluszsav fokozatos csökkenést mutatott (majdnem 60%) a dió érési folyamatának előrehaladtával. A fenolos vegyületek jelentős része a dió külső rétegeiben koncentrálódik [9,27]. A 2. számú fa, amelynek termése alacsonyabb olajtartalommal rendelkezett, magasabb összes fenoltartalommal bírt, ami arra utal, hogy a zsírfelhalmozódás és a fenolbioszintézis függetlenül szabályozódik és genotípus-specifikus metabolikus eloszlási mintákat tükrözhet. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat során kapott mintázat alapján a dióolajminták hasonló profilt mutattak, ami arra utal, hogy lipid-összetételük kvalitatív szempontból nagyrészt hasonló. A minták és olívaolaj esetében megfigyelhető sávok egymástól elkülönülő R_f tartományban jelentek meg. A magasabb R_f értékű sávok kevésbé poláris lipidfrakciók jelenlétére utalnak. Növényi olajokban ezek jellemzően triacilglicerolokból állnak [28]. A középső R_f -tartományban gyengébb intenzitású, diffúz sávok voltak megfigyelhetők, míg a fitoszterol-standardok jól elkülönülő sávokat mutattak, megkönnyítve a hasonló migrációjú komponensek összehasonlítását. A dióolajminták kromatográfiás mintázata hasonlóságot mutatott az olívaolaj mintáival. Emellett egyes sávok migrációja a fitoszterol standardokéhoz közeli R_f -tartományban jelent meg, ami a fitoszterol jellegű komponensek jelenlétére utalhat.

Fiziológiai szempontból a PCOS az egyik leggyakrabban tanulmányozott endokrin rendellenesség a reprodukív korú nők körében. A szindróma gyakori velejárója a menstruációs ciklus perturbációja, például oligomenorrhoea vagy amenorrhoea formájában [13,29]. PCOS esetén gyakran megfigyelhető krónikus, alacsony fokú gyulladás, amely a gyulladással kapcsolatos biomarkerek emelkedé-

sével jár, míg az oxidatív stressz hozzájárul a metabolikus és reprodukció zavarok kialakulásához [4,12,16]. A megnövekedett ROS-szintek és gyulladásos mediátorok hozzájárulhatnak a metabolikus és reprodukció zavarok kialakulásához, többek között az inzulinjelátvitel és a szteroidogenezis kedvezőtlen befolyásolásán keresztül [16]. Emiatt a PUFA-k egyre nagyobb figyelmet kapnak a PCOS kutatásában, mivel modulálhatják a gyulladásos folyamatokat, az inzulinérzékenységet, valamint a lipid- és glükózanyagcserében résztvevő gének expresszióját [4,12,13,23]. Bár a legtöbb vizsgálat a tengeri eredetű omega-3 zsírsavakra összpontosít, a dióban található ALA szintén hozzájárulhat kedvező metabolikus és gyulladáscsökkentő hatásokhoz [15].

Bár ez a tanulmány nem vizsgálta a klinikai eredményeket, a dióból származó többszörösen telítetlen zsírsavak és antioxidáns vegyületek tárolás közbeni stabilitásának megőrzése releváns lehet, amikor a diót a metabolikus és reprodukció egészség étrendi stratégiáiban fontolóra vesszük.

Következtetések

Vizsgálatunk alapján a *Juglans regia* zsírsavprofilja a vizsgált tárolási körülmények között viszonylag stabil maradt, és valamennyi mintacsoportban a linolsav dominanciája volt megfigyelhető. A tárolási mód és a betakarítási év elsősorban az összpolicenol-tartalmát és az antioxidáns aktivitást befolyásolta. A gázkromatográfiás vizsgálatok során a mintákban főként terpén jellegű komponenseket azonosítottunk, míg jelentős mennyiségű oxidációs marker nem volt kimutatható. A vékonyréteg-kromatográfiás elemzés valószínűsítette a fitoszterolok jelenlétét. Eredményeink hozzájárulnak a dió és a diópogácsa bioaktív komponenseinek jobb megismeréséhez, ugyanakkor a megfigyelt összefüggések és a PCOS étrendi támogatásában betöltött lehetséges szerepük igazolásához további vizsgálatok szükségesek.

Rövidítések jegyzéke

- ALA – alfa-linolénsav
- DHA – dokozahexaénsav
- DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
- EI – Elektronionizáció (Electron Ionization)

- EPA – eikozapentaénsav
- FAME – zsírsav-metilészterek (Fatty Acid Methyl Esters)
- GAE – Galluszsav-egyenérték (Gallic Acid Equivalent)
- GC-MS – gázkromatográfia-tömegspektrometria (Gas Chromatography–Mass Spectrometry)
- LDL – alacsony sűrűségű lipoprotein-koleszterin (Low Density Lipoprotein Cholesterol)
- MUFA – egyszeresen telítetlen zsírsavak (Monounsaturated Fatty Acids)
- n.d. – nem detektálható (not detectable)
- NIST – National Institute of Standards and Technology
- PCOS – polycisztás ovarium szindróma
- Ph.Eur. – Európai Gyógyszerkönyv (European Pharmacopoeia)
- PMOS – poliendokrin metabolikus ovárium szindróma
- PPO – polifenol-oxidáz (Polyphenol-oxidase)
- PUFA – többszörösen telítetlen zsírsavak (Polyunsaturated fatty acids)
- Rf – retenciósfaktor (Retention factor)
- ROS – reaktív oxigénfajták (Reactive oxygen species)
- RSA – szabadgyökfogó aktivitás (Radical Scavenging Activity)
- RT – retenciósidő (Retention Time)
- SD – standard deviáció
- SFA – telített zsírsavak (Saturated Fatty Acids)
- TPC – teljes fenoltartalom (Total Phenolic Content)
- VRK – vékonyréteg-kromatográfia
- WK – dióbél (Walnut Kernel)
- WW – teljes dió (Whole Walnut)

Köszönetnyilvánítás

A kutatást az Erdélyi Múzeum-Egyesület Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztálya, valamint a magyarországi Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kara finanszírozta (301/2026/P.2/EMEOGYSZ).

Irodalom

(Lásd az angol nyelvű cikk végén.)