

Annales
Instituti
Archeologici

Godišnjak
Instituta za
arheologiju

XIX - 2023

UDK 902/904
ISSN: 1848 6363



Glavna i odgovorna urednica / Editor in chief
Katarina Botić

Tehnički urednici / Technical editors
Katarina Botić
Marko Dizdar

Uredništvo / Editorial board
Marko Dizdar, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Hrvoje Kalafatić, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Ana Konestra, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Siniša Krznar, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Andreja Kudelić, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Bartul Šiljeg, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Asja Tonc, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Marina Ugarković, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Mario Gavranović, Austrian Archaeological Institute, Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria
Boštjan Laharnar, Narodni muzej Slovenije, Ljubljana, Slovenija
Alenka Tomaž, Fakulteta za humanistične studije, Univerza na Primorskem, Koper, Slovenija
Vesna Bikić, Arheološki institut, Beograd, Srbija
Perica Špehar, Filozofski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija
Miklós Takács, BTK Institute of Archaeology, Research Centre for the Humanities ELKH, Budapest, Hungary

Izdavački savjet / Editorial committee

Juraj Belaj, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Saša Kovačević, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Goranka Lipovac Vrkljan, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Daria Ložnjak Dizdar, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Branka Migotti, Zagreb, Hrvatska
Ivana Ožanić Roguljić, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Ante Rendić-Miočević, Zagreb, Hrvatska
Tajana Sekelj Ivančan, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Tihomila Težak-Gregl, Zagreb, Hrvatska
Tatjana Tkalčec, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska
Željko Tomičić, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb, Hrvatska
Ante Uglešić, Sveučilište u Zadru, Odjel za arheologiju, Zadar, Hrvatska
Snježana Vrdoljak, Institut za arheologiju, Zagreb, Hrvatska

Prijevod na engleski / English translation
Marko Maras i autori

Lektura / Language editor
Katarina Botić i autori (hrvatski jezik/Croatian)
Marko Maras (engleski jezik/English)

Nakladnik / Publisher
Institut za Arheologiju
Institute of Archaeology

Adresa uredništva / Editor's office address

Institut za arheologiju
/ Institute of Archaeology
Jurjevska ulica 15
HR-10000 Zagreb
tel 385 (0) 1 615 0250
fax 385 (0) 1 605 5806
e-mail: iarh@iarh.hr
web: http://www.iarh.hr

Dizajn / Design
Umjetnička organizacija OAZA

Korektura / Proofreaders
Katarina Botić

Računalni slog / Layout
Hrvoje Jambrek

Annales Instituti Archaeologici uključeni su u indekse: Clarivate Analytics services – Emerging Sources Citation Index, SciVerse Scopus – Elsevier, Amsterdam. / Annales Instituti Archaeologici are included in the indexes: Clarivate Analytics services – Emerging Sources Citation Index, SciVerse Scopus – Elsevier, Amsterdam.

Izrađeno uz financijsku potporu Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske. / Made with the financial support of the Ministry of Science and Education of the Republic of Croatia.

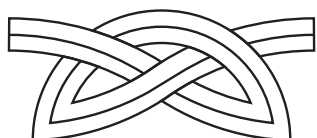
E-izdanja. Publikacija je dostupna u digitalnom obliku i otvorenom pristupu na <https://hrcak.srce.hr/en/aia> / E-edition. The publication is available in digital and open access form at <https://hrcak.srce.hr/en/aia>

Ovaj rad licenciran je pod Creative Commons Attribution By 4.0 međunarodnom licencom. / This work is licenced under a Creative Commons Attribution By 4.0 International Licence.



Annales
Instituti
Archeologici

Godišnjak
Instituta za
arheologiju



Prethodna priopćenja Preliminary reports

7–18

Andreja Kudelić
Filomena Sirovica

Lončarski tehnološki potpis: prilog poznavanju ranog brončanog doba kontinentalne Hrvatske
Pottery technosignature: a contribution to the knowledge in the Early Bronze Age of continental Croatia

19–38

Alenka Tomaž
Monika Zorko

Prehistoric settlement at Ribnica near Brežice (south-east Slovenia)
Prapovijesno naselje u Ribnici kod Brežica (jugoistočna Slovenija)

39–52

Marina Ugarković
Eduard Visković
Martina Korić
Pio Domines Peter
Antonela Barbir
Martina Čelhar

Prapovijesni lokaliteti otoka Hvara: nove spoznaje o gradinama Vela Glava i Liković
Prehistoric sites on the island of Hvar: new insights about Vela Glava and Liković hillforts

53–61

Asja Tonc
Slavica Filipović

Bilješka o amfori s natpisom iz Osijeka
A brief note on an amphora with inscription from Osijek

62–69

Mislav Fileš
Ivana Ožanić Roguljić
David Ruß
Wolfgang Neubauer
Gerhard Stüttler

Geofizička istraživanja na prostoru sela Kopačevo (Baranja)
Geophysical survey in the area of the village of Kopačevo (Baranja)

70–75

Martina Korić
Marina Ugarković

ΚΑΣΙ[...] na otoku hvaru? Novi nalaz grčkog utega s grafitom iz Fara
ΚΑΣΙ[...] on the island of Hvar? A new find of a Greek loom weight with a graffito from Pharos

76–91

Marina Ugarković
Pio Domines Peter

Bilješka o lokalitetu Gradina (Vinogradišće) na otoku Visu
A note on the site of Gradina (Vinogradišće) on the island of Vis

92–123

Marina Ugarković
Ana Konestra
Pio Domines Peter
Martina Korić
Kristina Turkalj
Sara Popović

Topografija i stratigrafija jugoistočnoga predgrađa antičkoga Fara: prvi podaci iz probnih arheoloških istraživanja
Topography and stratigraphy of the south-eastern suburb of ancient Pharos: First data from trial archaeological excavations

Pregledni rad Review paper

124–142

Mateja Hulina

Analize organskih ostataka iz keramike i prijedlog procedure uzorkovanja keramičkih ulomaka s hrvatskih nalazišta
Organic residue analysis of pottery and sampling procedure for Croatian sites proposal

Stručni rad Professional paper

143-148

Marina Ugarković
Martina Korić

O aktivnostima i rezultatima druge godine
AdriaCos projekta (HRZZ UIP-2020-02-2419)
On activities and results of the second year of the
AdriaCos project (CSF UIP-2020-02-2419)

Prikaz Review

149-151

Katarina Botić

Arheologija općine Klakar – izložba i katalog,
Muzej Brodskog Posavlja, 2023.
Archaeology of Klakar Municipality – exhibition and
the catalogue, Museum of Brod-posavina County,
2023

Karta nalazišta Map of sites

1. Kopačevo
2. Osijek
3. Općina Klakar
4. Kurilovec – Belinščica
5. Ribnica kod Brežica
6. Vis – Gradina
7. Hvar – Vela Glava
8. Hvar – Stari Grad (Far, *Pharos*)
9. Hvar – Liković



Analize organskih ostataka iz keramike i prijedlog procedure uzorkovanja keramičkih ulomaka s hrvatskih nalazišta

Organic residue analysis of pottery and sampling procedure for Croatian sites proposal

Pregledni rad >
Prapovijesna arheologija
Review paper >
Prehistoric archaeology

Mateja Hulina¹

(1) Institut za arheologiju
Jurjevska ulica 15
HR-10000 Zagreb
mhulina@iarh.hr
ORCID:0009-0007-6026-6707r

Primljeno Received 15. 11. 2023.
Prihvaćeno Accepted 11. 12. 2023.
doi.org/10.33254/aia.19.1.9

Ključne riječi: organski ostatci, lipidi, keramika, kemijske analize, uzorkovanje, kontaminacija

Key words: organic residues, lipids, pottery, chemical analyses, sampling, contamination

Analize organskih ostataka (ORA) iz keramike danas su često upotrebljavan i važan dio arheoloških istraživanja. Mogu nam pružiti informacije o prehrani ili upotrebi keramičkih posuda te mnoge druge o svakodnevnom životu arheoloških populacija, koje bi bez kemijskih analiza bile izgubljene.

Kemijski spojevi koji se najčešće sačuvavaju u keramici i stoga su vrlo pogodni za ove vrste analiza su lipidi (npr. masne kiseline, trigliceridi, alkoholi, alkani, esteri voska, ketoni). Postoji nekoliko metoda ekstrakcije lipida iz keramike koji ovise o tome što se želi saznati, a danas se najčešće koriste direktna ekstrakcija kiselinom u metanolu i ekstrakcija otapalom. Nakon ekstrakcije, rade se analize na plinskom kromatografu (GC), plinskom kromatografu – masenom spektrometru (GC-MS) i kad je moguće analiza izotopa ¹³C iz palmitinske i stearinske kiseline (GC-C-IRMS).

U ovom radu kratko su opisane navedene metode, kemijska pozadina te mogućnosti, odnosno primjeri već provedenih istraživanja koja su uključivala analize organskih ostataka. Kako svaka analiza započinje uzimanjem uzoraka gdje je najvažnije izbjeći kontaminacije, donesen je prijedlog procedure uzorkovanja keramičkih ulomaka za analize organskih ostataka, uz naglasak da uz adekvatno pakiranje uzorka (aluminijaska folija), istraživaču treba pružiti što je više moguće kontekstualnih informacija. Također, predložen je obrazac koji bi se prilagodio uz uzorke za analize organskih ostataka.

Organic residue analysis (ORA) of pottery is a frequently used and important part of archaeological research today. It can provide information about the diet or the use of pottery and many other aspects of daily lives of archaeological populations, which would otherwise be lost.

The chemical compounds that are most often preserved in ceramics and are therefore very suitable for this type of analysis are lipids (e.g. fatty acids, triglycerides, alcohols, alkanes, wax esters, ketones). There are several methods of extracting lipids from ceramics, depending on what we want to find out; those most commonly used are direct acid extraction and solvent extraction. After the extraction, analyses are performed by gas chromatography (GC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and, when possible, ¹³C isotope analysis from palmitic and stearic acid (GC-C-IRMS).

This paper briefly describes the mentioned methods, the chemical background, and the possibilities and examples of the already conducted research including ORA. Organic residue analysis begins with sampling, where it is very important to avoid contamination; therefore, a proposal is made for the procedure of sampling pottery sherds for ORA, with the emphasis on adequate sample packaging (aluminium foil). It is also important to note that the researcher should be provided with as much contextual information as possible. Also, a proposal for a sampling form for ORA is provided.



Uvod

Organski ostatci u (ili na) stijenkama keramičkih posuda važan su dio istraživanja svakodnevnog života arheoloških populacija, posebno njihove prehrane te načina uporabe određenih keramičkih posuda. Ovi su ostatci prilično česti (do 80 % posuda) i daju nam informacije koje bi inače bile izgubljene (Gregg 2009; Stacey 2009), a mogu se detektirati jedino kemijskim analizama.

Kemijske analize organskih ostataka iz keramike, najčešće analize lipida, mnogo rjeđe proteina, danas se već gotovo rutinski izvode kao dio arheoloških istraživanja, no kod nas, što zbog cijene što zbog slabe dostupnosti laboratorija i stručnjaka, ova se istraživanja još uvijek provode u nešto manjoj mjeri. Koristeći moderne analitičke tehnike i instrumente organski ostatci se mogu detektirati čak i u najmanjim tragovima, te jedan mali, jednostavan, svakodnevni predmet kao što je ulomak keramičke posude, može nam dati pregršt informacija o onome tko ga je upotrebjavao. Pomoću ovih analiza do sad je otkriven cijeli niz različitih supstanci kao što su životinjske i mliječne masti, biljna ulja i voskovi, pčelinji vosak, smole, masti morskih sisavaca i riba, itd.

Budući da su analize ove vrste kod nas još prilično nove te ne postoji sustav uzimanja uzoraka koji bi se mogao jedinstveno primijeniti na svim nalazištima, u ovom radu donosim kratak pregled istraživanja i metodologije, prijedlog procedure uzorkovanja keramičkih posuda i ulomaka za analizu organskih ostataka da bi se maksimalno smanjila mogućnost kontaminacije i povećala mogućnost dobrih rezultata te donosim prijedlog popratnog obrasca.

Što su organski ostatci?

Organski ostatci u različitim oblicima česti su nalazi na arheološkim nalazištima. Javljaju se u obliku fizičkih ostataka kosti, ostataka biljaka (drvo, ugljen, karbonizirane sjemenke), različitih smola, ljepila, vlakana, pigmenta, te u obliku manje primjetnih ostataka kao što su primjerice masti, ulja, smole, voskovi i drugi spojevi, odnosno njihovi sastavni dijelovi – molekule. Upotreba kemijskih spojeva/molekula i produkta njihovog raspada za detekciju i identifikaciju određenog organskog ostatka (npr. biljka – žitarica, proso, lisnata biljka, životinja – preživač, nepreživač, riba), odnosno da bi se dobile informacije o ljudskim aktivnostima u prošlosti, temelji se na konceptu arheoloških biomarkera (Evershed 2008). Biomarkeri mogu biti različite molekule (lipidi, proteini, ugljikohidrati, DNA, aminokiseline i sl.; na primjer, masne kiseline za životinjsku mast, određeni esteri voska, alkoholi i alkani za pčelinji vosak, biljni steroli za biljni materijal, miliacin za proso, ω -(*o*-alkilfenil) alkanoične kiseline za ribu), a koriste se tako da se njihova kemijska struktura i distribucija u arheološkom materijalu uspoređuje s modernim organizmima, da bi se odredilo čemu je ta molekula (biomarker), odnosno

cijeli organski ostatak pripadao. Zbog toga je veoma bitno poznavati i razumjeti promjene koje se događaju tijekom raspada i degradacije kako samih organskih ostataka, tako i molekula koje ih tvore (Evershed 1993; 2008; Evershed et al. 1991b; 2001).

Na keramičkim posudama organski ostaci se mogu sačuvati u tri oblika (Evershed 2008: 903, 904; Gregg 2009; Stacey 2009):

1. Fizički ostatci sadržaj posude, što je moguće samo u posebnim uvjetima kao što su pustinjski – npr. kanopske posude iz Egipta (Ribenchini et al. 2009).
2. Vidljivi ostatci na unutarnjim ili vanjskim stijenkama posude – npr. karbonizirani ostatci hrane, ljepila, impregnacije, dekoracije ili čađe, koji se često sastoje od smola, voskova ili bitumena (Evershed 2008). Ovakva vrsta ostataka rijetka je u klimatskim uvjetima na našem prostoru.
3. Nevidljivi ostaci apsorbirani u stijenkama posude, najčešće lipidi, što je najčešća vrsta organskih ostataka i mogu se sačuvati u više od 80 % posuda (Evershed 2008; Stacey 2009).

Kako i gdje se sačuvaju organski ostatci?

Organski ostatci o kojima je ovdje riječ nastaju apsorcijom organske materije (npr. hrane) uporožne stijenske keramike kod različitih aktivnosti, a njihova očuvanost ovisi o mnogim čimbenicima, od okoliša i geografskih uvjeta, kiselosti tla, temperature, vlage, prisutnosti kisika i mikroba do same posude i načina na koji je ona izrađena i korištena. Tako su najpovoljniji stabilni suhi (pustinjski) ili vrlo vlažni uvjeti (rijeke, jezera) te oni bez kisika i kiselina tla (Copley et al. 2005; Drieu 2017; Gregg, Slater 2010; Smyth, Evershed 2015), a što se tiče temperatura, najpovoljnije su hladne i vlažne klime (Debono Spiteri 2012).






Veliki utjecaj na očuvanost lipida ima i način na koji se predmet (u ovom slučaju keramička posuda) koristio, koliko dugo i koliko intenzivno te kako je tretiran nakon iskopavanja (Evershed 2008: 910; Stacey 2009: 2–3). Posuda koja se koristila duže i intenzivnije očekivano bi trebala pokazati i više očuvanih lipida, posebno ako se upotrebljavala za pripremu hrane. Također, životinjske masti će ostaviti jači trag od biljnih, a bitne su i temperature na kojima se sadržaj posuda zagrijavao, odnosno kuhao. Najpogodnije su temperature od oko 100° C, dok se određeni dio organskog materijala sačuva i na temperaturama većima od 400° C i čak do 600° C (Drieu 2017). Osim toga, treba uzeti u obzir i to da su neke posude tretirane različitim supstancama (npr. mast, mlijeko, vosak) da bi se stvorio vodonepropusni sloj, te neki tragovi lipida mogu biti posljedica takvog tretmana, a ne kuhanja (Drieu 2017; Salque et al. 2013), a neke su posude imale i druge primjene – za skladištenje, posluživanje, proizvodnju meda, za medicinske svrhe, preradu smole i sl. ili su tretirane primjerice lijepljenjem ili ukrašene ukrasom organskog podrijetla.

Također, na očuvanje organskih ostataka

utječe i sama posuda, odnosno materijal od kojeg je izrađena te način izrade. Eksperimenti L. Drieu (2017; Drieu et al. 2019) pokazali su da keramičke posude niske poroznosti (kad je keramička smjesa siromašna inkluzijama ili su površine glačane) apsorbiraju manje lipida, no kad se lipidi apsorbiraju u takve posude, oni se bolje sačuvaju jer mikroorganizmi teže prodiru kroz njih. U okolišu bez prisutnosti kisika s malom aktivnosti

mikroorganizama najviše se lipida očuva u posudama s većom poroznosti, a najveća učestalost i količina sačuvanih lipida zabilježena je na posudama velike poroznosti i zaglađene (ne glačane) površine.

Ukratko, očuvanost lipida u keramičkoj posudi rezultat je svega što se s tom posudom događalo od njezine proizvodnje do analize (npr. Drieu 2017; Roffet-Salque et al. 2017; Stacey 1999) (sl. 1).

		Apsorpcija lipida →	Gubitak lipida ←	Promjena
Nova posuda		Impregnacija Ukrašavanje		
Upotreba posude		Sadržaj posude – upotreba jednom ili više puta? Jedna funkcija/namirnic a ili više njih?	Jako reaktivni spojevi (zagrijavanjem) Površinski ostatci (čišćenjem/pranj em)	Kuhanje Skladištenje Zagrijavanje Karbonizacija Čišćenje
Razbijanje posude/ bacanje u otpad		Sadržaj iz sekundarne uporabe		Sekundarna upotreba Gorenje/spaljivan je Deponiranje
Ukop		Organski spojevi iz tla Mikrobi	Gubitak kroz curenje/vodu	Djelovanje mikroba
Iskopavanje i nakon iskopavanja		Otisci prstiju Plastifikatori Ljepilo, kemikalije za konzervaciju	Površinski ostatci	Rukovanje Čišćenje Skladištenje Promjena uvjeta okoliša Konzervacija

Sl. 1 Grafički prikaz procesa koji utječu na očuvanje lipida (prema: Dunne et al. 2017b: 12, sl. 14; doradila: M. Hulina)

Fig. 1 Graphic representation of processes influencing lipid preservation (after: Dunne et al. 2017b: 12, Fig. 14; adapted by: M. Hulina)

Što su lipidi i primjeri biomarkera

Organski spojevi koji se najčešće pronalaze i analiziraju u keramičkim posudama su lipidi jer se očuvaju bolje i češće od drugih biomolekula – primjerice proteina, ugljikohidrata ili DNA (Debono Spiteri 2012; Evershed 1993). Eksperimenti su pokazali da je potencijalni kapacitet apsorpcije lipida jednog keramičkog ulomka oko 10 mg/g, no u arheološkom kontekstu obično se sačuva tek oko 100 µg/g (Evershed 2008). Zbog promjena u strukturi lipida kao što su hidrogenizacija dvostrukih veza, aromatizacija prstenova, gubitak funkcionalnih grupa, posebno estera i dvostrukih veza koje se događaju uslijed obrade i prerade hrane ili drugog sadržaja, različitih okolišnih čimbenika i aktivnosti mikroba tijekom životnog ciklusa posude (Debono Spiteri 2012; Aillaud 2001), ono što se sačuva u arheološkom materijalu poprilično se razlikuje od stanja u svježim namirnicama (Debono Spiteri 2012) te je potrebno dobro poznavati kemijske procese koji se događaju.

Lipidi su velika skupina kemijskih spojeva čije je zajedničko svojstvo da su hidrofobni (nisu topljivi u vodi), a topljivi su u organskim otapalima (npr. u ugljikovodicima, kloroformu, benzenima, eterima, alkoholima). Sastoje se od ugljika – C, vodika – H (i kisika – O). Dije se na jednostavne lipide koji sadržavaju samo masne kiseline i alkohol (triacilgliceroli/trigliceridi/neutralni lipidi i voskovi) i složene lipide (fosfolipidi, glikolipidi, neosapunjive tvari) (Štraus, Petrik 2009: 124). U širem smislu, uključuju spojeve kao što su masne kiseline i njihovi derivati, karotenoidi, terpeni, steroidi i žučne kiseline, a u užem su to masne kiseline i njihovi derivati te s njima povezani spojevi (Christie 2014). Služe kao izvori energije, mogu stvarati energetske pričuve u organizmu, grade stanične membrane te imaju značajnu ulogu u staničnoj signalizaciji (Christie 2014; Štraus, Petrik 2009: 124), zajedno s proteinima i ugljikohidratima glavne su sastavnice svih životinjskih i biljnih organizama.

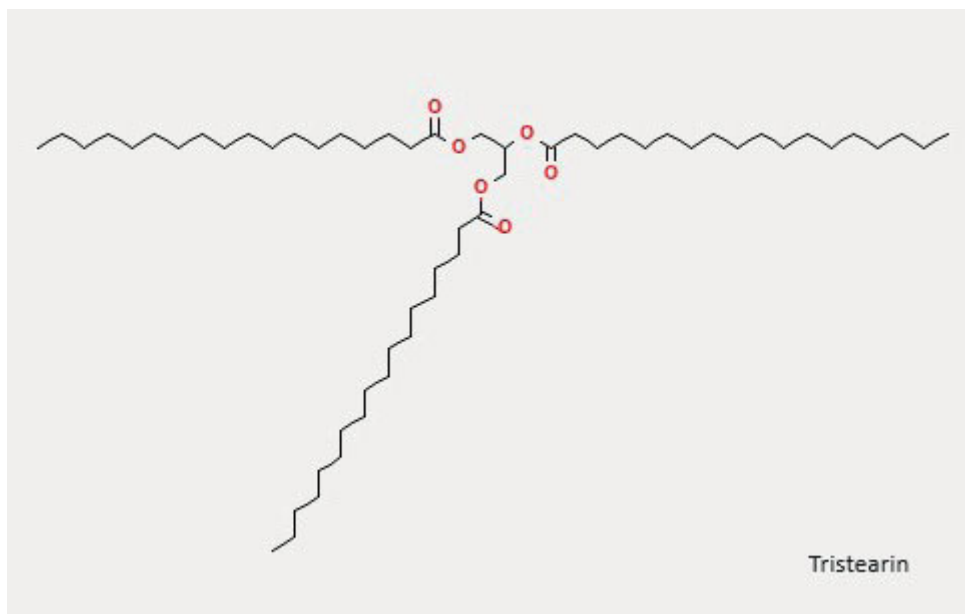
Masne kiseline i triacilgliceroli

U živim bićima lipidi se u najvećem udjelu (95 %) nalaze u obliku triacilglicerola (odnosno triglicerida) koji se sastoje od molekule glicerola povezane s tri masne kiseline, što masne kiseline čini najvažnijim spojevima kod analiza organskih ostataka (sl. 2.).

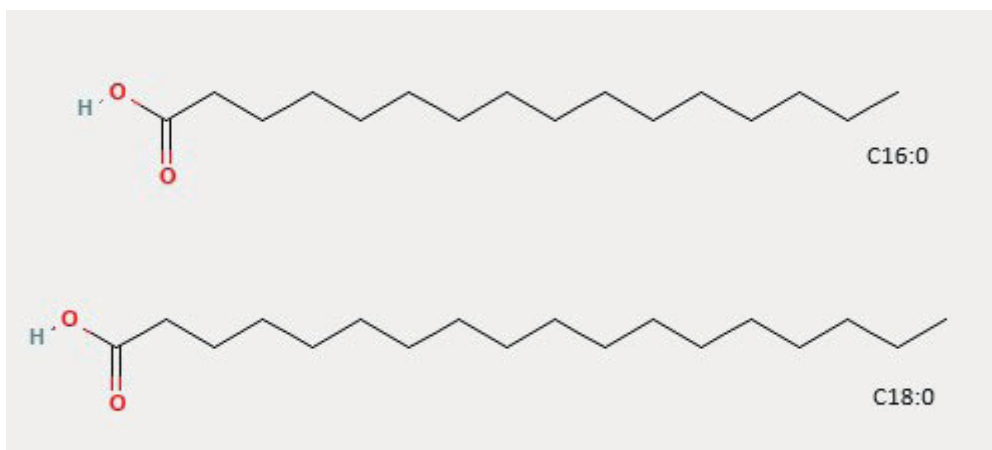
Masne kiseline su karboksilne kiseline (kemijske formule R-COOH pri čemu je R alkil, a COOH funkcionalna skupina) s više od deset atoma ugljika koje su pri standardnim uvjetima (temperatura 20° C, tlak 1013 hPa) u krutom stanju. Identificirano je više od 1000 masnih kiselina, no kod biljaka i životinja najčešće ih je 50 (Christie 2014; Gunstone 1992: 1-2). Najučestalije su molekule ravnih lanaca parnih brojeva atoma ugljika od 12 do 24, no postoje i one s neparnim brojem atoma ugljika te kružne i razgranate molekule. Mogu biti nezasićene (sa svim jednostrukim vezama) te jednostruko ili višestruko zasićene (s jednom ili više dvostrukih veza). Zasićene masne kiseline mogu imati cis- i trans- konfiguraciju, što znači da su molekule vodika kod dvostruke veze ili s iste u prvom slučaju ili različite strane lanca u drugom slučaju (Christie 2014; Gunstone 1992).

Najčešće masne kiseline u prirodi, a i najbitnije za analize u arheologiji su masne kiseline sa 16 (C_{16:0} – palmitinska kiselina) i 18 (C_{18:0} – stearinska kiselina) atoma ugljika (Evershed 2008) (sl. 3).

Zasićene masne kiseline najčešće se nalaze u životinjskim proizvodima (uključujući mlijeko i mliječne proizvode) te u uljima kokosa i palme, jednostruko nezasićene javljaju se u biljnim uljima (npr. maslinovo, suncokretovo, ulja orašastih plodova), dok su višestruko nezasićene tipične za ribu i biljna ulja (Hansel et al. 2004). Od nezasićenih masnih kiselina, najčešće su oleinska (C_{18:1}), javlja se i palmitoleinska kiselina (C_{16:1}), a kod riba i gadoleinska (C_{20:1}) i eruična (C_{22:1}). To su kiseline cis konfiguracije, dok se one trans konfiguracije rijetko nalaze u prirodi i to najčešće kao mali dio životinjskog tkiva nepreživača (npr. svinja) u kojima se formiraju prilikom probave (hidrogenacija) (Christie 2014).



Sl. 2 Triacilglicerol – tristearin
Fig. 2 Tryacilglycerol – tristearin
(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11146#section=2D-Structure>, 13.11.2023.)



Sl. 3 Masne kiseline – palmitinska i stearinska kiselina

Fig. 3 Fatty acids – palmitic and stearic acid

(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/18962935#section=2D-Structure>, 13.11.2023.)

Masne kiseline neparnih brojeva atoma ugljika, npr. pentadekanska ($C_{15:0}$) ili margarinska ($C_{17:0}$), ili one razgranatih lanaca nastaju prilikom djelovanja bakterija, a nalaze se i primjerice kod preživača ili u mliječnim mastima (Christie 2012a; Correa-Ascencio 2014; Whelton et al. 2021).

Ako su prisutne dovoljne količine palmitinske i stearinske kiseline ($> 5 \mu\text{g/g}$) one mogu poslužiti za utvrđivanje podrijetla organskog ostatka analizom stabilnih izotopa ^{13}C .

ω -(*o*-alkilfenil) alkanoične kiseline (APAA)

ω -(*o*-alkilfenil) alkanoične kiseline (C_{16} , C_{18} , C_{20} i C_{22}) indikatori su za kuhanje morskih organizama (Copley et al. 2004; Craig et al. 2007; Cramp et al. 2014; Hansel et al. 2004; Evershed et al. 2008b), a nastaju zagrijavanjem višestruko nezasićenih masnih kiselina i preživljavaju lakše od njih. Indikatori morskih organizama su i izoprenoična, pristanična i pitanična kiselina (Evershed et al. 2008b; Hansel et al. 2004).

Dikarboksilne kiseline

α,ω -dikarboksilne kiseline kratkih lanaca ($C_5 - C_{14}$) nastaju od nezasićenih masnih kiselina, a najčešća od njih, azelaična kiselina (C_9) formira se iz oleinske kiseline ($C_{18:1}$). Ove masne kiseline indikatori su tvari bogatih nezasićenim masnim kiselinama, kao što su biljna ulja (Copley et al. 2005; Dunne et al. 2012; Hansel, Evershed 2009).

Hidroksi kiseline

2-hidroksi kiseline dugih lanaca ($C_{16} - C_{26}$) biomarkeri su za ulje sjemenki (npr. ricinusovo ulje) ili pčelinji vosak (15-hidroksi-hekadekanoična i 17-hidroksi-oktadekanoična kiselina) (Christie 2013; Tulloch 1970). Dihidroksi kiseline ($C_{16} - C_{22}$) se javljaju u mastima morskih životinja, a $C_{18} - C_{24}$ u biljnim uljima (Copley et al. 2004; 2005; Hansel, Evershed 2009)

Ketoni

Ketoni dugih lanaca (posebno neparnih brojeva atoma ugljika C_{23-33}) brojni su u voskovima

lisnatih biljaka (Evershed et al. 1991a; 1995; Raven et al. 1997), pa su zajedno s *n*-alkoholima i *n*-alkanima biomarkeri za lisnato povrće (Charters et al. 1997; Evershed et al. 1991a). Na primjer, nonakosan, nonakosan-15-on i nonakosan-15-ol su biomarkeri za biljke iz roda *Brassica*, odnosno kupus i njemu srodne biljke (npr. brokula, cvjetača, kelj) (Charters et al. 1997; Evershed et al. 1991a; 1991b).

Velike količine ketona C_{29} , C_{31} , C_{33} i C_{35} nastaju zagrijavanjem životinjskih masti na više od 300°C te su indikatori pripreme hrana, odnosno kuhanja ili pečenja (Evershed et al. 1995).

n-Alkani

n-Alkani se javljaju u biljnim voskovima, najčešće oni neparnih lanaca između 25 i 35 atoma ugljika. Javljaju se i u pčelinjem vosku gdje dominira alkan C_{27} (heptakosan), dok je kod voskova biljnog podrijetla dominantan alkan C_{29} (nonakosan) (Regert et al. 2001).

n-Alkani javljaju se i kod fosilnih goriva (petrolej, bitumen, nafta) i za razliku od voskova, kod njih su jednako pristuni *n*-alkani parnih i neparnih lanaca (Correa-Ascencio 2014; Hofmann et al. 1992).

n-Alkanoli (alkoholi)

n-Alkoholi dugih lanaca važan su sastavni dio biljnih voskova i pčelinjeg voska, a najčešći su oni parnih lanaca 22 do 32 atoma ugljika (Christie 2012b).

Steroli

Sljedeći oblik lipida važan za identifikaciju životinjskih i biljnih ostataka su steroli, čija je funkcija da su strukturalne komponente staničnih membrana i produkti njihove degradacije. Zoosteroli su životinjski steroli i najčešći od njih je kolesterol, dok su biljni ili fitosteroli – sitosterol, kampesterol i stigmasterol (Correa-Ascencio 2014; Evershed 1993).

Voskovi

Voskovi koje pronalazimo kao ostatke hrane, mogu biti pčelinji vosak ili biljni voskovi

koji dolaze s površine lišća ili drugih dijelova biljaka. Ovi voskovi se sastoje od masnih kiselina, n-alkana, n-alkanola (alkohola) i voštanih estera. Arheološki ostatci voska sadržavaju voštane estere s 40 do 52 atoma ugljika, alkane nepranih lanaca od 23 do 33 atoma ugljika, dugolančane alkohole parnih brojeva atoma ugljika od 24 do 34 i slobodne masne kiseline parnih brojeva atoma ugljika od 20 do 34. Dominira $C_{24:0}$ masna kiselina, uz veliki postotak palmitinske kiseline koja nastaje uslijed hidrolize voštanih estera (Charters et al. 1995; Heron et al. 1994; Regert et al. 2001). Kod pčelinjeg voska od alkana dominira C_{27} , a kod voskova biljnog podrijetla C_{29} (Regert et al. 2001).

Terpeni i srodni spojevi

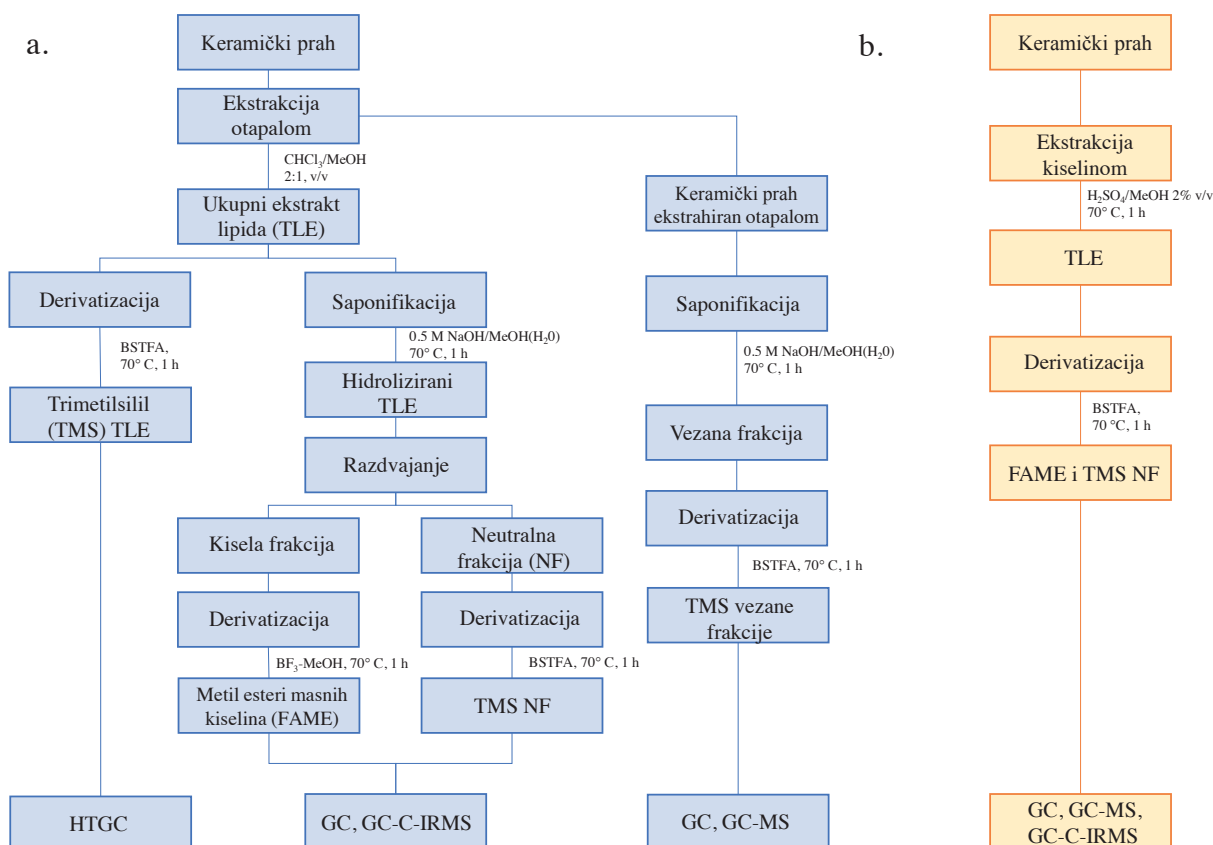
Osim iz prehrambenih izvora, lipidi mogu doći iz onih ne prehrambenih, obično iz smola, bitumena i katrana, te pčelinjeg voska – ove supstance su služile za popravljjanje, lijepljenje, dekoraciju, impregnaciju, pečačenje i dr., a lipidi koji se tipično nalaze u takvim ostacima (osim već spomenutog

pčelinjeg voska) su di- tri- i seskviterpeni i metil dehidroabietična kiselina (Correa-Ascencio 2014).

Metode ekstrakcije lipida

Metode ekstrakcije lipida iz keramičkih posuda ovise o istraživačkom pitanju, očekivanim rezultatima i planovima za daljnju analizu, a mogu se ponešto razlikovati i u različitim laboratorijima (npr. Correa-Ascencio, Evershed 2014; Evershed et al. 1991b; Evershed 2008; Gregg 2009; Regert 2011).

Metode ekstrakcije koje se danas rutinski koriste su ekstrakcija otapalom (npr. Evershed et al. 1991b; 2001; Evershed 2008) i direktna ekstrakcija metanolom i kiselinom (Correa-Ascencio, Evershed 2014). Bitna razlika između ovih metoda je što svaka od njih cilja na različite vrste molekula, pa je ponekad jedan uzorak potrebno podvrgnuti više različitih ekstrakcija. Shematski prikaz tijeka analize, odnosno koraka, ovisno o različitim vrstama ekstrakcija prikazan je na slici 4.



Sl. 4 Shematski prikaz tijeka analize organskih ostataka: a ekstrakcija otapalom; b ekstrakcija kiselinom (prema: Correa-Ascencio 2014: 62, sl. 3.2; doradila: M. Hulina)

Fig. 4 Schematics of organic residue analysis steps: a solvent extraction; b direct acid extraction (after: Correa-Ascencio 2014: 62, Fig. 3.2; adapted by: M. Hulina)

Ekstrakcija otapalom (engl. solvent) je često korištena metoda kojom se dobivaju molekule kao što su masne kiseline, esteri voska, n-alkoholi i n-alkani, ketoni dugih lanaca, tri-, di- i monoacilgliceridi. No, problem je u tome što jako polarne molekule kao što su dikiseline ili hidroksi kiseline ovom metodom ne mogu biti izvučene iz keramičke matrice te je potrebno paralelno koristiti druge metode (Correa-Ascencio, Evershed 2014; Evershed 2008; Regert 2011).

Postupak same ekstrakcije ponekad se ponešto razlikuje kod različitih laboratorija, no uglavnom se radi ekstrakcija otopinom diklorometana (DCM) u metanolu dok se ne dobije ukupni ekstrakt lipida (engl. total lipid extract – TLE) (npr. Copley et al. 2003; 2005; Evershed 1993; Evershed et al. 1991b; 1999). Nakon ekstrakcije otapalom slijedi saponifikacija dodavanjem otopine natrijevog hidroksida (NaOH) u metanolu s vodom nakon čega se izdvaja ne-saponificirana ili neutralna frakcija, a onome što ostane nakon toga dodaje se i klorovodična kiselina (HCl) te se izdvaja saponificirana ili kisela frakcija (npr. Evershed et al. 1993; 1999).

Direktna ekstrakcija kiselinom (direct methanolic acid extraction) je postupak (Correa-Ascencio, Evershed 2014) koji se sve više koristi posljednjih nekoliko godina. Ova ekstrakcija radi se s pomoću metanola i sumporne kiseline (H_2SO_4), a konačni produkt je ukupni ekstrakt lipida koji se sastoji od metilnih estera masnih kiselina (FAME). Prednosti ove metode su da ona izvlači i do 20 % više lipida iz keramike i to iz manje količine uzorka (potreban je oko 1 gram), a izvlači i jako polarne molekule. Nadalje, brža je jer odmah nastaju metil esteri, što znači da je kasnije prije analize potrebno napraviti samo derivatizaciju s BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamid) da bi se dobili trimetilsil esteri. Nedostatci su što se prilikom tretiranja kiselinom raspadaju tri-, di- i monoacilgliceridi i esteri voska na svoje sastavne dijelove (glicerol i masne kiseline, odnosno masne kiseline i alkohole). Zato je ponekad potrebno na istom uzorku napraviti i ekstrakciju otapalom (primjerice ako je prisutna velika količina n-alkohola i alkana koji ukazuju na vosak).

Prije same analize na instrumentima, da se neki podatci ne bi izgubili, potrebno je učiniti da molekule budu termalno stabilne, a dovoljno reaktivne postupkom tzv. derivatizacije. Dvije su metode koje se najčešće koriste kod analiza lipida. Jedna je metilacija ili dodavanje metilne skupine (CH_3) na skupine $-COOH$ (npr. Evershed et al. 1991b; 1993; 1999), no ne djeluje sa skupinama $-OH$, pa izostaju primjerice alkoholi ili triacilgliceridi. Spojevi koji nastaju metilacijom su metilni esteri (npr. Evershed et al. 1999; Copley et al. 2003). Kod već spomenute direktne ekstrakcije kiselinom u metanolu ovaj postupak nije potrebno dodatno raditi. Druga metoda je siliacija – dodavanje trimetilsilila (TMS) na $-COOH$ i $-OH$ skupine. Svakom uzorku doda se N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamid (BSTFA) i nastaju trimetilsil esteri (TMS). Ona traje samo oko 48 sati i ako se uzorak ne analizira u tom vremenu, potrebno ju je ponoviti (npr. Copley et al. 2003; Evershed et al. 1999).

Metode analize

Glavne analitičke metode koje se upotrebljavaju kod analize lipida iz keramičkih posuda su: plinska kromatografija (gass chromatography – GC), GC na visokoj temperaturi (HT-GC); plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS); plinska kromatografija – izgaranje – masena spektrometrija omjera izotopa (gass chromatography – combustion – isotope ratio mass spectrometry – GC-C-IRMS).

Plinska kromatografija (GC) služi prvenstveno za razdvajanje molekula i kvantifikaciju, masena spektrometrija pokazat će o kojim se spojevima radi, a ako je u uzorku dovoljno količine $C_{16:0}$ i $C_{18:0}$ masnih kiselina, može se napraviti i analiza izotopa, čije će vrijednosti pokazati podrijetlo uzorka.

Plinska kromatografija (GC) je metoda koja se upotrebljava za razdvajanje tvari (plinova, tekućina i krutih tvari) i mjerenje molekula na principu njihova fizičkog ponašanja, odnosno brzini putovanja kroz uređaj (Evershed 1992a). Uređaj bilježi vrijeme retencije (vrijeme koje je prošlo od injektiranja uzorka do bilježenja maksimalne vrijednosti) određene molekule dok prolazi kroz kolonu u plinu nosaču (najčešće je to helij). Vrijeme retencije određeno je plinskim tlakom određene molekule: što je tlak veći, molekula će provesti više vremena u mobilnoj fazi, a proći će kroz kolonu brže te će vrijeme retencije biti kraće (Evershed 1992a).

Jedan od detektora koji se uparuju s plinskim kromatografom je FID (engl. flame ionization detector). Radi na principu da se spojevi koji se izlučuju iz GC kolone zapale u struji vodika/ zraka te nastaju ioni koji povećaju potencijal između vrha uređaja i elektrode. Rezultat se bilježi na kromatogramu (Evershed 1992a).

Druga vrsta detektora je maseni spektrometar. Masena spektrometrija služi za mjerenje molekularnih masa pojedinih spojeva koji mogu biti prisutni u vrlo sitnim tragovima. Kod organskih molekula mase i relativne količine molekularnih i pseudo molekularnih iona i fragmenata odražavaju njihovu strukturu, pa se s pomoću ove metode mogu odrediti i strukture, iako je za izomere često potrebno gledati i vrijeme retencije, pa se metoda kombinira s plinskom ili tekućom kromatografijom (Evershed 1992b). Maseni spektrometar zapravo mjeri omjer mase i naboja iona (m/z), a s obzirom na to da je naboj u većini slučajeva +1 (jer se molekule ioniziraju oduzimanjem elektrona), ono što se očita na masenom spektru jednako je molekularnoj masi određenog iona.

Kao ulazni mehanizam za analizu lipida, najčešće se upotrebljava plinski kromatograf jer radi na sličnom principu kao maseni spektrometar (oba koriste plinsku fazu) te se dobro slažu. Kao izvor iona, kod analize lipida najčešće se koristi elektronski ionizator (EI). Produkt ove tehnike je kation koji nastaje oduzimanjem iona molekuli koja se analizira. On se označava kao M^+ i daje molekularnu masu analizirane molekule (Evershed 1992b). Osnovni princip na kojem radi GC-MS je ovaj: plinski kromatograf spojen je na maseni spektrometar, kad se molekule izluče iz

kolone plinskog kromatografa, maseni spektrometar ih ionizira, obično oduzimanjem elektrona, zatim ione manipulira jakim električnim ili magnetskim poljem da bi se na kraju razdvojili i razvrstali prema molekularnoj masi. Rezultati se bilježe u obliku kromatograma i masenih spektara (Gregg 2009).

Analiza stabilnih izotopa ugljika

Izotopi su atomi nekog kemijskog elementa koji imaju jednak broj protona i elektrona te različiti broj neutrona. Dije se na radioaktivne izotope koji se raspadaju tijekom vremena (stoga se mogu koristiti za datiranje arheoloških nalaza) i stabilne izotope čiji se udio nikad ne mijenja, stoga se u arheologiji upotrebljavaju za istraživanje primjerice prehrane ili okoliša (Evershed et al. 1994; 1999). U kontekstu analize organskih ostataka upotrebljavaju se palmitinska i stearinska kiselina zbog prisutnosti u svim živim organizmima u većim količinama (Craig et al. 2003; Evershed 2008; Spangenberg et al. 2006).

Razlike u vrijednosti izotopa ugljika u $C_{16:0}$ i $C_{18:0}$ masnim kiselinama nastaju zbog razlika u biosintezi kod različitih organizama (Evershed et al. 2002a; 2002b), odnosno zbog različitih putova asimilacije ugljika (npr. C3 i C4 biljke)¹ i njegove fiksacije te mogu reflektirati prehranu i različite klimatske i geografske uvjete (Meir-Augeunstein 2002). C3 biljke imaju vrijednosti $\delta^{13}C$ oko -27 ‰, a C4 oko -13 ‰ (Sealy 2001), stoga doprinos C3 i C4 biljaka u prehrani značajno utječe na vrijednosti izotopa (Debono Spiteri 2012; Roffet-Salque et al. 2016). Kako bi se zanemarila komponenta okoliša

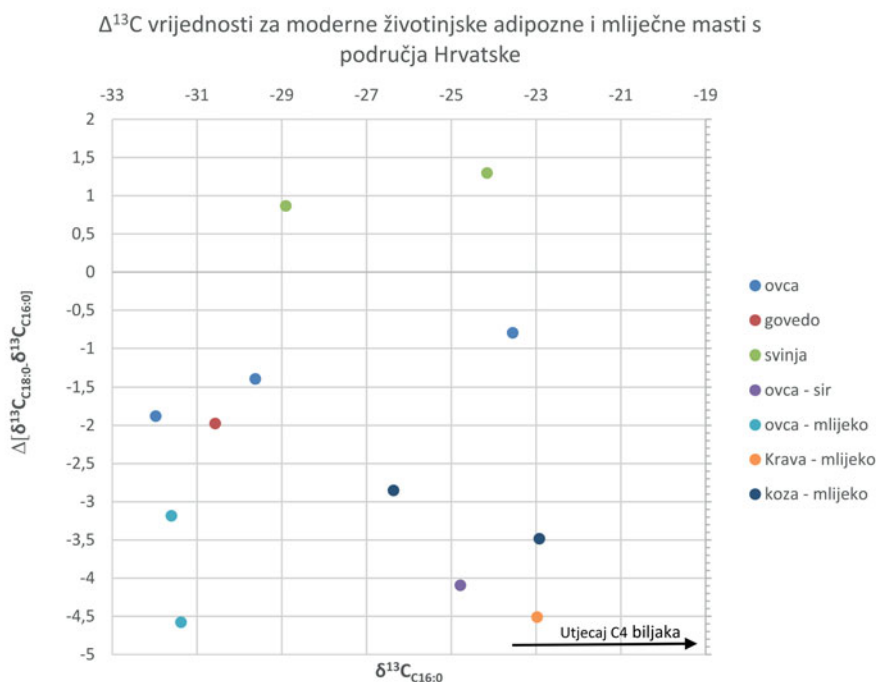
i prehrane te ostale varijacije koje se samo mogu pripisati metaboličkim i fiziološkim procesima u organizmu, upotrebljava se vrijednost $\Delta^{13}C$, odnosno razliku između $\delta^{13}C$ kod $C_{18:0}$ i $C_{16:0}$ ² masnih kiselina koje tako omogućuju razlikovanje masti iz različitih izvora (Dunne et al. 2012; Evershed et al. 1999; 2001; 2002; Roffet-Salque et al. 2016).

Metoda za analizu izotopa ugljika iz masnih kiselina je GC-C-IRMS (gass chromatography – combustion – isotope ratio mass spectrometry) ili plinska kromatografija – izgaranje – masena spektrometrija omjera izotopa. Ovom se analizom mogu odrediti omjeri izotopa određenih spojeva unutar mješavine, ovdje palmitinske i stearinske kiseline unutar masti ili ulja. Spojevi se najprije razdvoje u plinskom kromatografu, zatim izgaraju do ugljikovog dioksida (CO_2) i na kraju IRMS određuje relativni omjer $^{13}C/^{12}C$ u CO_2 (Evershed et al. 1994; Meir-Augeunstein 2002). Vrijednosti iz arheoloških uzoraka uspoređuju se s referentnim vrijednostima dobivenim iz modernih masti, koje se korigiraju zbog različitih vrijednosti atmosferskog ugljika između današnjeg i predindustrijskog razdoblja za -1,14 ‰ (Friedli et al. 1986; Spangenberg et al. 2006).

Dobiveni rezultati uspoređuju se s poznatim vrijednostima za određene životinjske vrste dobivenim iz arheološkog i modernog referentnog materijala, te se također interpretiraju ovisno o kontekstu i sukladno prostoru i vremenu nalaza. Slika 5 prikazuje referentne vrijednosti $\Delta^{13}C$ na modernom materijalu iz Hrvatske (preuzeto iz Hulina 2020), te dobro naglašava jedan od problema u sakupljanju ovakve vrste uzoraka, a to je da kad životinja nije hranjena u laboratorijskim uvjetima, ne možemo biti

1 C3 i C4, te CAM biljke razlikuju se po načinu na koji obavljaju fotosintezu. C3 biljke su uglavnom biljke umjerenog pojasa (one koje su bile široko rasprostranjene u Europi tijekom prapovijesti), dok su C4 uglavnom biljke tropskog pojasa (npr. kukuruz, proso) koje se, osim prosa, rijetko pojavljuju u europskoj prapovijesti.

2 $\delta^{13}C$ je omjer izotopa ^{13}C i ^{12}C , a $\Delta^{13}C$ je razlika između njihovih vrijednosti za stearinsku i palmitinsku kiselinu, odnosno $\Delta^{13}C = \delta^{13}C(C_{18:0}) - \delta^{13}C(C_{16:0})$.



Sl. 5 Primjer rezultata analize stabilnih izotopa – referentne vrijednosti modernih životinjskih masti s područja Hrvatske (Hulina 2020: 251, sl. 9.1)
Fig. 5 Stable isotopes results example – reference values for modern animal fats from Croatia (Hulina 2020: 251, Fig. 9.1)

sigurni čimese hranila. No, ovakvi su podatci važni jer se vrijednosti izotopa trebaju uspoređivati s referentnim vrijednostima s istog klimatskog i geografskog područja iz kojeg dolazi i arheološki uzorak.

Upotreba u arheologiji

Analize organskih ostataka iz keramičkih posuda, kao što je već spomenuto, pružaju uvid u informacije koje bi bez ovih analiza, barem djelomično, bile izgubljene.

Neka od istraživanja u kojima su primijenjene ove analize su istraživanja prehrane arheoloških populacija i njihovih strategija opstanka i takva su zapravo najbrojnija. Ova istraživanja uglavnom zahtijevaju veći broj uzoraka (najmanje 30, češće puno više).

Nekoliko velikih projekata i veliki broj radova bavilo se istraživanjem početaka upotrebe mlijeka i mliječnih proizvoda u prapovijesti. Na primjer, istraživanje o upotrebi mlijeka u neolitiku na području Britanije pokazalo je da je njegova upotreba raširena već od ranog neolitika (Copley et al. 2003), najstarija zabilježena upotreba mlijeka na Bliskom istoku bila je vezana za goveda (Evershed et al. 2008a), a rani tragovi upotrebe mlijeka i mliječnih proizvoda pronađeni su i na području Sahare (Dunne et al. 2012). Na području Poljske otkriveni su tragovi procesuiranja mliječnih masti u cjedilima, odnosno proizvodnje sira (Salque et al. 2012), a mlijeko se upotrebljavalo od početka neolitika i na području sjevernog Atlantika (Cramp et al. 2014). Novije istraživanje o najstarijoj upotrebi mlijeka u srednjoj Europi uključuje i istraživanje gena za toleranciju na laktozu (Evershed et al. 2022), a dostupni su i mnogi drugi radovi na tu vrlo popularnu temu.

Tragovi mlijeka, uz životinjske masti, pronađeni su i na području centralnog Balkana od neolitika (Stojanovski et al. 2020) i na području Slovenije u neolitik i eneolitik (Šoberl et al. 2014).

Otkriveni su i ostatci različitih životinjskih masti – primjerice preživača (govedo, ovca, koza) i nepreživača (svinja) koje su najčešće glavni predmet istraživanja (npr. Carrer et al. 2016; Copley et al. 2005; Craig et al. 2005; 2013; Dunne et al. 2012; Dudd, Evershed 1998; Evershed et al. 2002a; 2002b; 2008a; Mukherjee et al. 2007; Salque et al. 2013), masti morskih životinja (npr. Copley et al. 2004; Craig et al. 2007; 2011; Evershed et al. 2008b; Hansel et al. 2004; 2011; Hansel, Evershed 2009; Heron et al. 2010; 2013), uključujući i istraživanje na najstarijoj keramici iz Japana koja je upotrebljavana za procesuiranje ribe (Craig et al. 2013), zatim masti divljih životinja (Craig et al. 2012), konja (Dudd et al. 2003) i peradi (Colonese et al. 2017a).

Analize lipida otkrile su i dokaze o upotrebi biljne hrane. Primjerice, na području Sahare otkriveni su najstariji dokazi za preradu biljaka na keramici (Dunne et al. 2017a), otkriveni su i dokazi za upotrebu prosa (Heron et al. 2016) i drugih žitarica od prapovijesti (Colonese et al. 2017b; Hamman et al.

2019) te kupusnjača primjerice u srednjovjekovnoj Engleskoj (Evershed et al. 1991a; 1991b). Upotrebom biljaka klimatski bliskim našem području na Balkanu i u sjevernoj Grčkoj bavi se rad Urem-Kotsou et al. (2018).

Nekoliko istraživanja bavilo se i pokušajima pronalaska vina ili piva te drugih alkoholnih pića (npr. Drieu et al. 2020; Pecci et al. 2020, Rageot et al. 2019a; 2019b).

Osim u istraživanju prehrane, analize lipida koristan su alat i za istraživanje npr. načina izrade i upotrebe određenih oblika posuda te njihovog ukrašavanja i popravaka što također u širem smislu podrazumijeva i istraživanje tehnoloških promjena i iskorištavanja resursa. Primjeri takvih istraživanja su analiza najstarijih Jōmon keramičkih posuda iz Japana, koje predstavljaju tehnološku inovaciju, na kojima su otkriveni tragovi iskorištavanja morskih resursa (ribe) (Craig et al. 2013), zatim istraživanje koje je pokazalo upotrebu bitumena za ukrašavanje na neolitičkim posudama iz Sirije (Connan et al. 2004), upotrebu voska za impregnaciju keramičkih posuda u neolitik (Salque et al. 2013) i smole brezove kore za popravljivanje rimsko-britanskih posuda (Charters et al. 1993).

Osim za impregnaciju posuda, pčelinji vosak može biti i indicacija za upotrebu meda, a dokazi za njegovu upotrebu javljaju se od ranog neolitika (Roffet-Salque et al. 2015).

Nadalje, neka istraživanja se fokusiraju na vezu oblika, odnosno tipa posude i njezinog sadržaja, odnosno na funkciju posuda i moguću specijalizaciju u njihovoj upotrebi koja može biti unutar jednog nalazišta, između različitih nalazišta, kroz vrijeme i slično. Primjer takvog istraživanja je rad o tarionicima s nekoliko britanskih rimskih i starosjedilačkih, urbanih i ruralnih lokaliteta, na kojima je utvrđeno da su se koristili za pripremu hrane biljnog podrijetla, ponekad pomiješane sa životinjskim mastima, a na nekim starosjedilačkim nalazištima i s mlijekom (Cramp et al. 2011), zatim ranoneolitička cjedila iz Poljske na kojima su pronađeni tragovi mliječnih masti te je moguće da su služila za izradu sira, dok se na istim nalazištima meso pripremalo u loncima, a mliječni proizvodi također u zdjelama (Salque et al. 2013). Organski ostatci mogu doprinijeti i razumijevanju unutarnje strukture i organizacije naselja i njegovih stanovnika, a primjer toga je istraživanje keramike iz Heuneburga (Rageot et al. 2019a; 2019b) koje je pokazalo različitu raspodjelu dobara (pivo, vino, žitarice) i upotrebu tipova posuda (domaće i importi, setovi za piće) unutar naselja, moguće od strane različitih društvenih skupina.

O pripremi hrane u posudama svjedoče nam ketoni pronađeni u posudama za kuhanje koji indiciraju kuhanje na visokim temperaturama (> 300° C), a pronađeni su npr. na rimsko-britanskim posudama iz Engleske (Cramp et al. 2012).

Organski ostatci iz keramike mogu svjedočiti i o ritualima, kao što je primjerice neolitička žlijebljena keramika iz Britanije koja se najčešće povezuje s ostacima masti nepreživača, odnosno svinja, a posude pronađene u ritualnom kontekstu

sadržavale su iste ostatke te su tako pokazale da se svinjetina konzumirala i u ritualne svrhe (Mukherjee et al. 2007). Još jedan primjer su tragovi tamjana pronađeni u srednjovjekovnoj kršćanskoj pogrebnoj keramici iz Belgije (Baeten et al. 2014).

U različitim posudama pronađeni su i ostatci kozmetičkih ili medicinskih supstanci; npr. rimska olovna posuda iz Londona sadržavala je pastu od svinjske masti, olova i škroba (Evershed et al. 2004), također rimske brončane posude za medicinske pripravke iz Britanskog muzeja sadržavale su tragove životinjskim masti, smole, pčelinjeg voska, šećera, cinkovih i olovnih soli koje su najvjerojatnije doista bile neki medicinski pripravci (Stacey 2011).

Također, istraživanja na rimskim lampicama pokazala su da se kao gorivo koristilo maslinovo ulje, ponekad pomiješano sa životinjskom masti (Kimpe, Jacobs, Waelkens 2001).

Organski ostatci mogu biti i pokazatelji trgovine i razmjene resursa i dobara, kao na primjer smole pronađene na rimskim posudama iz Britanije korištene u pogrebnim ritualima, koje su bile uvezene iz Arabije i istočne Afrike (Brettell et al. 2014) ili rimske amfore za vino iz trgovačkog kompleksa u Oplontisu (Pecci et al. 2017).

Organski ostatci, odnosno masne kiseline koje oni sadrže mogu se i radiokarbonski datirati što direktno datira vrijeme upotrebe posude (Casanova et al. 2020).

Nekoliko istraživanja provedeno je i na materijalu iz Hrvatske, no uglavnom se radilo o vrlo malom broju uzoraka. To su istraživanja npr. na eneolitičkoj keramici s nalazišta Đakovo Franjevac gdje su otkriveni ostatci pčelinjeg i biljnog voska (Stern 2011), zatim na keramici vučedolske kulture iz Ervenice i Damića gradine gdje su otkriveni ostatci životinjskih masti i pčelinjeg voska (Miloglav 2011). Neolitički i eneolitički keramički material analiziran je i u radu Miloglav i Balen (2019) u kojem autorice uspoređuju tipove posuda i rezultate dobivene GC-MS analizama kojima su pronađeni ostatci životinjskih masti i pčelinjeg voska. Nekoliko radova uključuje neolitičke keramičke ulomke iz Dalmacije: C. Spiteri (Debono Spiteri 2012) je u okviru doktorskog rada analizirala ulomke iz špilje Nakovane i objavila ih zajedno s drugim mediteranskim materijalom (Debono Spiteri et al. 2016). Pronađeni su ostaci masti preživača i mliječnih masti. McClure et al. (2018) na ranoneolitičkim ulomcima iz Pokrovnika i Danila pronašli su dokaze za najstariju proizvodnju sira na Mediteranu. U svojem doktorskome radu M. Hulina (2020) analizirala je veći broj posuda iz neolitika i eneolitika Dalmacije i istočne Hrvatske.

Prijedlog hodograma istraživanja organskih ostataka iz keramike

Gore su navedena samo neka od mogućih istraživačkih pitanja i primjena analiza organskih ostataka iz keramike te primjeri do sad objavljenih istraživanja, no ista ili slična pitanja, a i mnoga

druga, mogu se postaviti i na materijalu iz drugih nalazišta, razdoblja itd. Mogućnosti su beskonačne, a treba započeti s planiranjem projekta.

Prvi korak svakog istraživanja, pa isto tako i onog koje uključuje analize organskih ostataka iz keramike, je plan projekta koji bi trebao uključivati jasno definirano pitanje te kako i na koji način će analize organskih ostataka pomoći odgovoriti na njega, a o njemu ovise i strategija uzorkovanja (veličina uzorka, tipovi posuda, kontekst iz kojeg se prikupljaju uzorci – npr. kuća, grob) i vrsta analize (postoje različite vrste ekstrakcija za primjerice životinjske masti, vino, vosak), metode analize se razlikuju s obzirom na to što nas zanima (npr. mlijeko, životinjska mast, riba), hoće li biti potrebna analiza izotopa (da bi se razlikovali preživači, nepreživači, mlijeko) i sl. Važna stavka je i budžet jer su analize prilično skupe (obično 100+ eura po uzorku).

Uzorkovanje

Strategija uzorkovanja ovisna je najviše o pitanju na koje se pokušava odgovoriti, no i o vrsti nalazišta i planu projekta. Za generalna pitanja (npr. o prehrani) obično je dovoljno oko 20–30 uzoraka (svaki oko 2 grama keramičkog praha ili ulomak veličine barem kovanice od 2 eura), no ponekad je dovoljno i manje uzoraka (npr. ako se istražuje pojedini grob, pojedini objekt ili specifični tip posude na nekom nalazištu) ili je potrebno mnogo više.

Kako bi se u najvećoj mogućoj mjeri izbjegle kontaminacije nakon iskopavanja, idealno bi bilo odrediti uzorak za analizu već pri iskopavanju. Naime, svako rukovanje keramičkim ulomcima – pranje, pakiranje u plastične vrećice, lijepljenje, često diranje rukama i pregledavanje te na kraju konzervacija mogu biti izvori kontaminacije.

Primjerice, kolesterol i skvalen koji se nalaze na ljudskoj koži, ako se pronađu u analiziranim uzorcima smatraju se indikatorima moderne kontaminacije nastale uslijed rukovanja ulomcima, no sam kolesterol je dosta problematičan jer ponekad može doći do pogrešne interpretacije kao životinjske masti, iako ostali prisutni lipidi ukazuju da se radi o nečem drugom (Whelton et al. 2021). Kontaminacije također mogu doći iz plastičnih vrećica u obliku plastifikatora/ftalata, posebno ako su ulomci u tim vrećicama proveli puno vremena (Stacey 2009: 5), no prilikom analize rezultata takve se kontaminacije lako eliminiraju (Whelton et al. 2021). Pranje vodom ne smeta apsorbiranim ostacima, odnosno lipidima (Stacey 2009: 5), no u idealnom slučaju uzorak bi se trebao donijeti u laboratorij neopran, ponekad i s uzorkom zemlje da bi se, ukoliko je potrebno, na njemu mogle napraviti analize kontaminacije tijekom ukopavanja (Stacey 2009: 5). Iako se i kontaminacije nastale tijekom ukopavanja (npr. iz tla, od mikroba i različitih spojeva) i one moderne često mogu otkriti, problem nastaje ako se ulomak kontaminira u tolikoj mjeri da kontaminanti izdominiraju koncentraciju istraživanih biomarkera i više nije moguće dobiti točne

rezultate. Stoga treba vrlo oprezno postupati s njima.

Prilikom uzimanja uzorka, odmah tijekom iskopavanja na terenu treba uzeti suhi ulomak keramike (posušiti ako je u mokroj zemlji), zamotati ga u aluminijsku foliju ili beskiselinski papir, pa staviti u vrećicu ili kutiju; prilikom rukovanja trebalo bi oprati ruke, koristiti rukavice ili dirati samo folijom/papirom da bi se maksimalno izbjegle kontaminacije, posebno kremama za sunčanje ili za ruke.

Kod opranih ulomaka poželjno je da su oprani samo vodom, bez previše mehaničkog skidanja površine (lipidi će se sačuvati u unutrašnjosti stijenke), te se pakiraju na isti način kao i prethodni. Ako su ulomci uzeti iz muzeja ili depoa, poželjno je saznati i zabilježiti u kakvim su se uvjetima čuvali (u vrećicama ili kutijama, na kakvim temperaturama ili vlazi, jesu li tretirani nekim kemikalijama).

Ako nije moguće drugačije, mogu se uzeti i uzorci konzerviranih i rekonstruiranih posuda, no tada se izbjegava mjesto gdje su posude lijepljene, spojevi s gipsom, i bitno je prije analize organskih ostataka napomenuti čime su posude tretirane da bi se kontaminacija mogla prepoznati prilikom analize i interpretacije rezultata.

Osim svođenja kontaminacije prilikom rukovanja ulomcima na minimum, potrebno je izabrati i ulomak s najvećim potencijalom očuvanja lipida. Eksperimenti su pokazali da se lipidi u najviše slučajeva sačuvaju pri vrhu posude, posebno prilikom kuhanja masne hrane, dok se prilikom pečenja rasporede po cijeloj posudi, no još uvijek s najvećom koncentracijom pri vrhu (Stacey 2009: 2; Charters et al. 1993). Ponekad, posebno ako je to važno u kontekstu istraživanja, bilo bi dobro imati zastupljene kako različite dijelove posuda tako i različite tipove posuda, no uvijek u dovoljnom broju i to onih koji će najbolje odgovoriti na postavljano istraživačko pitanje.

Pridržavanjem gore navedenog trebao bi se izbjeći najveći broj problema koji se mogu javiti već kod uzorkovanja.

U nastavku teksta donosim hodogram uzorkovanja, koji bi trebao pomoći arheolozima izabrati optimalne uzorke i dobiti najbolje rezultate.

Hodogram uzorkovanja

1. Odrediti istraživačko pitanje/hipotezu
2. Odrediti broj uzoraka
3. Izabrati tipove posuda
4. Izabrati broj uzoraka određenog tipa
5. Odrediti laboratoriji provjeriti protokol uzorkovanja laboratorija
6. Spakirati keramički ulomak u aluminijsku foliju (ili beskiselinski papir), pa u vrećicu ili kutiju (izbjegavati kontaminacije – diranje rukama, pranje ako nije već oprano)
7. Ako se radi o cijeloj posudi ili otkinuti dio ili će se direktno uzorkovati usitnjavanjem u prah
8. Ako je posuda rekonstruirana izbjegavati kontaminirano mjesto (lijepilo, dodir s gipsom)
9. Ispuniti obrazac sa što više podataka
10. Poslati uzorke na uzorkovanje ili direktno u laboratorij, ovisno o dogovoru

Kako bi se dobili što bolji i točniji rezultati, potrebno je raspolagati čim većim brojem podataka koji će dati informacije o kontekstu nalaza – lokalitet i godina istraživanja, razdoblje, tip nalazišta (npr. naselje, groblje), kontekst nalaza (npr. jama, kuća, grob); ako su poznati i dostupni podatci o vrsti i kiselosti tla, vegetaciji na nalazištu i arheobotanički podatci, životinjske vrste, zatim tip i dio posude, faktura, ukras; ukoliko je posuda konzervirana, bitno je znati kojim kemikalijama je tretirana i na koji način je čuvana. Priložiti i fotografije (ili će osoba koja uzorkuje fotografirati).

Također je bitno napomenuti ako je potrebna i dodatna specifična vrsta ekstrakcije (npr. za vino).

U nastavku donosim prijedlog tablice, odnosno obrasca za uzorkovanje za analizu organskih ostataka koji će sadržavati osnovne podatke o uzorcima.

Predlažem slijedeći postupak pri uzorkovanju:

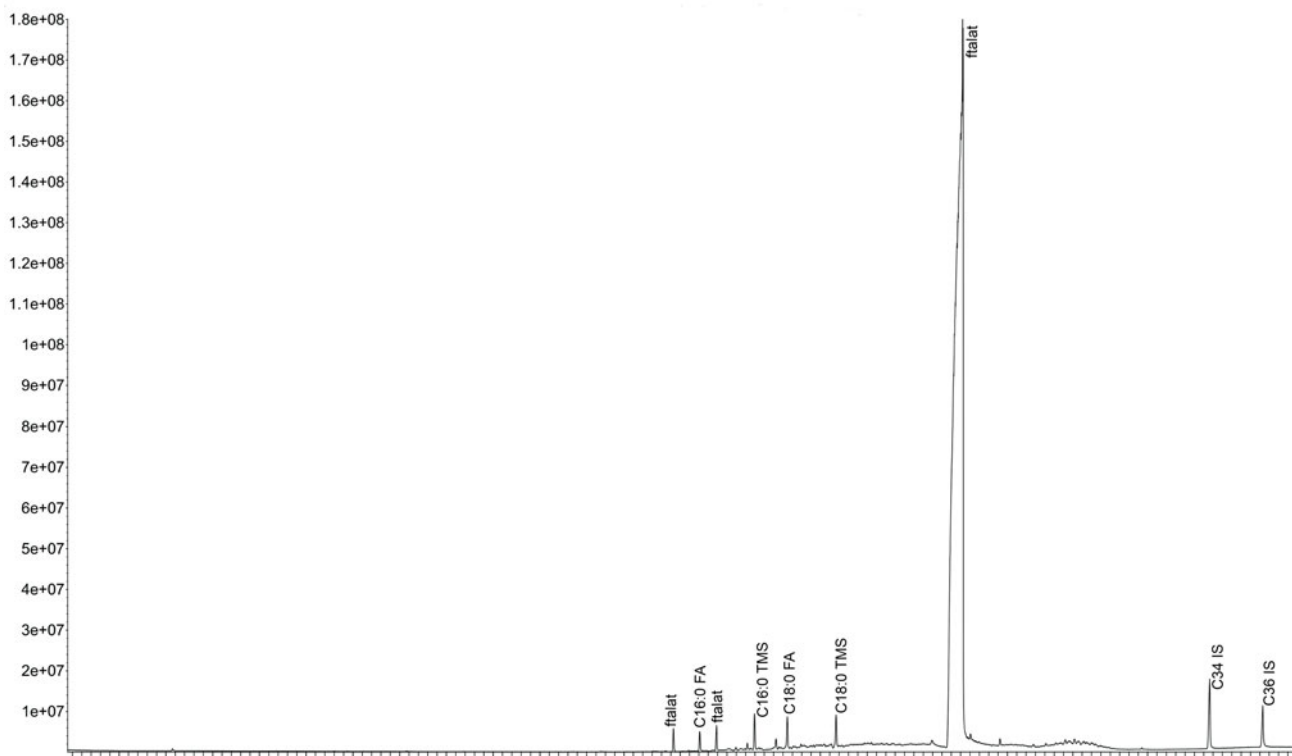
Mini bušilicom (Dremel) s vrhom opranim u diklorometanu ili acetonu usitni se oko 2 grama praha koji se sakupi u sterilne staklene bočice, površinski sloj se odstrani i baca da bi se dodatno isključile moguće kontaminacije. Ulomci se mogu usitniti i u tarioniku, također opranom u acetonu. Bočice se označe i čuvaju do slanja u laboratorij. Neki laboratoriji preferiraju da im se ulomci pošalju direktno, ako je to moguće, te se onda samo spakiraju u aluminijsku foliju i u vrećicu.

Problemi metodologije i interpretacije

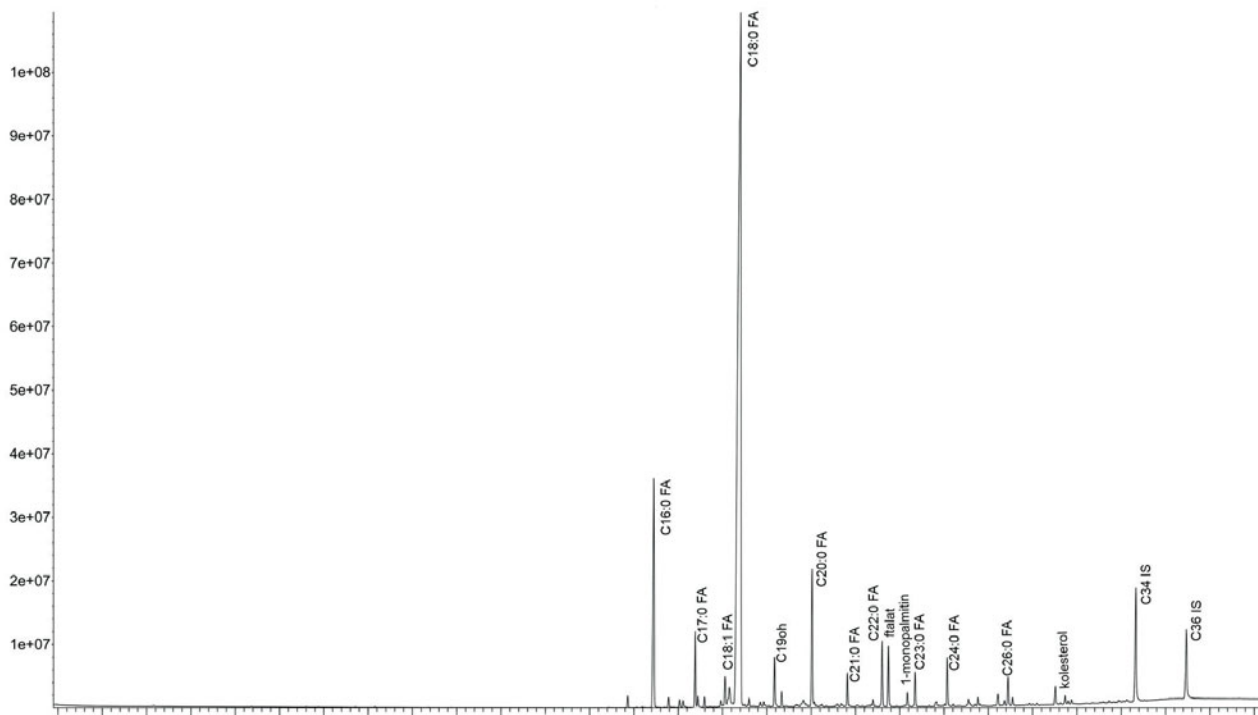
Iako su analize organskih ostataka danas sastavni dio mnogih istraživanja i daju vrlo vrijedne rezultate, imaju i mogućih problema, nedostataka i ograničenja, koje je bitno spomenuti, a mogu nastati u bilo kojem dijelu procesa, od prikupljanja uzoraka do završne interpretacije.

Prethodno su spomenuti mogući problemi s kontaminacijama prilikom prikupljanja uzoraka (plastifikatori, kolesterol, spojevi iz krema za ruke i sunčanje), a mogu nastati i kasnije u laboratoriju, prilikom ekstrakcije ili tijekom same analize (npr. od raspada kolone, otapala, prekoncentriranih prethodnih uzoraka); sl. 6 prikazuje kromatogram uzorka kontaminiranog plastifikatorima, dok sl. 7 prikazuje kromatogram bez kontaminacije koji je sadržavao životinjsku mast.

Najviše problema zapravo dolazi kod interpretacije (Whelton et al. 2021). To se primjerice može dogoditi prilikom slijepog korištenja baze podataka za identifikaciju spojeva što ponekad dovodi do pogrešne identifikacije – osoba koja radi identifikaciju treba dobro poznavati molekularne mase, metode ekstrakcije i derivatizacije i što je uopće moguće vidjeti u kromatogramu. Baze podataka pomažu, no uvijek treba sve provjeriti ručno. Što se tiče interpretacije rezultata, pogreške se mogu dogoditi zbog korištenja pogrešnih biomarkera ili onih koji nisu dovoljno specifični (npr. masne kiseline koje se javljaju kod različitih životinja). Biomarkeri bi morali biti karakteristični svojom strukturom ili izotopski te treba uzeti u obzir i način na koji se



Sl. 6 Kromatogram uzorka kontaminiranog plastifikatorima (autor: M. Hulina)
 Fig. 6 Chromatogram of a sample contaminated with plasticisers (author: M. Hulina)



Sl. 7 Kromatogram uzorka koji je sadržavao adipoznu mast preživača (autor: M. Hulina)
 Fig. 7 Chromatogram from a sample with adipose ruminant fat (author: M. Hulina)

mijenjaju tijekom vremena i uvijek koristiti cijeli kromatogram, a ne smo jedan biomarker ili dio kromatograma za interpretaciju (Whelton et al. 2021). Problemi nastaju i primjerice korištenjem omjera količina različitih masnih kiselina, što nije dovoljno precizno, zatim ne uzimanjem u obzir mješavina različitih tvari kod analize izotopa (npr. meso i pčelinji vosak, preživači i nepreživači, meso i riba) ili ignoriranjem odnosno nedovoljnim poznavanjem cijelog arheološkog konteksta. Ovaj problem se može riješiti uzimanjem u obzir svih dostupnih podataka.

pristupačnije – rade se u većem broju laboratorija i sve je veći broj stručnjaka koji se ovom disciplinom bave. Ova vrsta analiza sve se više uključuje i u istraživanja u Hrvatskoj (npr. Hulina 2020; McClure et al. 2018) što bi se svakako trebalo nastaviti i razvijati u budućnosti.

Zaključak

Analize organskih ostataka važan su dio arheoloških istraživanja i daju mnoge vrlo vrijedne informacije o samim keramičkim posudama (funkciji, izradi), prehrani, organizaciji naselja, ritualima, trgovini i sl., zapravo o ljudima koji su te posude upotrebljavali.

Da bi se ove analize mogle iskoristiti na najbolji mogući način, potrebno je pratiti određene smjernice koje su predložene u ovom radu – postaviti pitanje i hipotezu koja će na odgovarajući način uključiti analize organskih ostataka, odrediti adekvatnu vrstu i broj uzoraka, maksimalno izbjegavati kontaminacije kod čega je najbitnije pakirati uzorke u aluminijsku foliju prije slanja, te pružiti osobi koja analizira uzorke čim više informacija o kontekstu nalaza, posebno ako je to moguće i dostupno o okolišu, biljkama i fauni pronađenima na lokalitetu. No, kao i kod svih istraživanja, uvijek trebamo biti svjesni ograničenja i nedostataka ove metode i njezinih rezultata.

Osoba koja provodi analize treba učiniti sve potrebne korake da se uzorak dodatno ne kontaminira u laboratoriju, te da se dobiju kromatogrami bez pozadinskog šuma i s dobro definiranim kromatografskim pikovima (npr. odgovarajuća metoda ekstrakcije, ako je potrebno mijenjanje koncentracija uzorka dodavanjem heksana, redovito održavanje uređaja i validiranje metoda). Na temelju dostupnih podataka, kod konačne interpretacije uvijek treba uzeti u obzir cijeli kontekst – tip nalazišta, što je prisutno od biljaka, životinja, koji su bili mogući kontaminanti i slično. Ukratko, ako nešto izgleda kao pingvin u hrvatskom neolitikumu, ali mogla bi možda biti i svinja, vjerojatno nije pingvin.

No, prvi korak je na sakupljanju uzoraka, izbjegavanju kontaminacija i pružanju adekvatnih informacija stručnjacima koji će uzorkovati, analizirati i/ili interpretirati rezultate, a ovdje predložen obrazac trebao bi biti od pomoći u tome.

Analize organskih ostataka vrlo su koristan alat u arheološkim istraživanjima jer su primjenjive na sva razdoblja i sve vrste nalazišta i pomažu u odgovaranju na cijeli niz pitanja. Također nadopunjuju rezultate drugih disciplina, kako samo arheologije i tipologije keramike, tako i primjerice arheobotaničkih nalaza, zooarheologije, istraživanja drugih vrsta izotopa, ljudskih ostataka itd. Razvojem tehnologije, razvijaju se i nove metodologije, pronalaze novi biomarkeri i time se povećava točnost interpretacije, a postaju i

Internetski izvor

Internet source

AOCS Lipid library – <https://lipidlibrary.aocs.org/>

PubChem, National Library of Medicine, Bethesda, USA – <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 13.11.2023.)

Literatura

Bibliography

Aillaud, S. 2001. *Field and laboratory studies of diagenetic reactions affecting lipid residues absorbed in unglazed archaeological pottery vessels*. Unpublished PhD Thesis, University of Bristol, Bristol.

Bacten, J., Deforce, K., Challe, S., De Vos, D., Degryse, P. 2014. Holy Smoke in Medieval Funerary Rites: Chemical Fingerprints of Frankincense in Southern Belgian Incense Burners. *PLoS ONE*, Vol. 9(11), e113142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113142>

Brettell, R. C., Schotsmans, E. M. J., Walton Rogers, P., Reifarth, N., Redfern, R. C., Stern, B., Heron, C. P. 2014. 'Choicest unguents': molecular evidence for the use of resinous plant exudates in late Roman mortuary rites in Britain. *Journal of Archaeological Science*, Vol. 53(4), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.11.006>

Carrer, F., Colonese, A. C., Lucquin, A., Petersen Guedes, E., Thompson, A., Walsh, K., Reitmaier, T., Craig, O. E. 2016. Chemical analysis of pottery demonstrates prehistoric origin for high-altitude Alpine dairying. *PLoS ONE*, Vol. 11(4), e0151442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151442>

Casanova, E., Knowles, T. D. J., Bayliss, A., Dunne, J., Barański, M. Z., Denaire, A., Lefraque, P., di Lernia, S., Roffet-Salque, M., Smyth, J., Barclay, A., Gillard, T., Claßen, E., Coles, B., Ilett, M., Jeunesse, C., Krueger, M., Marciniak, A., Minniti, S., Rotunno, R., van de Velde, P., van Wijk, L., Cotton, J., Daykin, A., Evershed, R. P. 2020. Accurate compound-specific ¹⁴C dating of archaeological pottery vessels. *Nature*, Vol. 580(7804), 506–510. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2178-z>

Charters, S., Evershed, R. P. 1997. Simulation Experiments for Determining the Use of Ancient Pottery Vessels: the Behaviour of Epicuticular Leaf Wax During Boiling of a Leafy Vegetable. *Journal of Archaeological Science*, Vol. 24(1), 1–7. <https://doi.org/10.1006/jasc.1995.0091>

Charters, S., Evershed, R. P., Blinkhorn, P. W., Denham, V. 1995. Evidence for the mixing of fats and waxes in archaeological ceramics. *Archaeometry*, Vol. 37(1), 113–127. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1995.tb00730.x>

Charters, S., Evershed, R. P., Goad, L. J., Leyden, A., Blinkhorn, P. W., Denham, M. V. 1993. Quantification and Distribution of Lipid in Archaeological Ceramics, Implications for Sampling Potsherds for Organic Residue Analysis, and the Classification of Vessel Use. *Archaeometry*, Vol. 35(2), 211–223.

Christie, W. 2012a. Fatty acids: branched chain. Structures, occurrence and biosynthesis. *AOCS Lipid Library*, Dundee, Scotland.

Christie, W. 2012b. Waxes. Structure, composition, occurrence and analysis. *AOCS Lipid Library*, Dundee, Scotland.

Christie, W. 2013. Fatty acids: methylene-interrupted double bonds. Structures, occurrence and biochemistry. *AOCS Lipid Library*, Dundee, Scotland.

Christie, W. 2014. Fatty acids: straight-chain saturated. Structures, nomenclature and occurrence. *AOCS Lipid Library*, Dundee, Scotland.

Colonese, A. C., Lucquin, A., Guedes, E. P., Thomas, R., Best, J., Fothergill, B. T., Sykes, N., Foster, A., Miller, H., Poole, K., Maltby, M., Von Tersch, M., Craig, O. E. 2017a. The identification of poultry processing in archaeological ceramic vessels using in-situ isotope references for organic residue analysis. *Journal of Archaeological Science*, Vol. 78, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2016.12.006>

Colonese, A. C., Hendy, J., Lucquin, A., Speller, C. F., Collins, M. J., Carrer, F., Gubler, R., Kühn, M., Fischer, R., Craig, O. E. 2017b. New criteria for the molecular identification of cereal grains associated with archaeological artefacts. *Scientific Reports*, Vol. 7(1), 6633. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06390-x>

Connan, J., Nieuwenhuys, O. P., van As, A., Jacobs, L. 2004. Bitumen in early ceramic art: bitumen-painted ceramics from Late Neolithic Tell Sabi Abyad (Syria). *Archaeometry*, Vol. 46(1), 115–124. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2004.00147.x>

Copley, M. S., Hansel, F. A., Evershed, R. P. 2004. Organic residue evidence for the processing of marine animal products in pottery vessels from the pre-colonial archaeological site of Kasteelberg De east, South Africa. *South African Journal of Science*, Vol. 100, 279–283.

Copley, M. S., Berstan, R., Dudd, S. N., Aillaud, S., Mukherjee, A. J., Straker, V., Payne, S., Evershed, R. P. 2005. Processing of milk products in pottery vessels through British prehistory. *Antiquity*, Vol. 79(306), 895–908. <https://doi.org/10.1017/S0003598X00115029>

Copley, M. S., Berstan, R., Dudd, S. N., Docherty, G., Mukherjee, A. J., Straker, V., Payne, S., Evershed, R. P. 2003. Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain. *Proceedings of National Academy of Science*, Vol. 100(4), 1524–1529. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335955100>

Correa-Ascencio, M. 2014. *Elucidating diet and economy at the ancient city of Teotihuacan (150 BC–AD 650) via molecular and isotopic investigations of organic residues in archaeological pottery*. Unpublished PhD Thesis, University of Bristol, Bristol.

Correa-Ascencio, M., Evershed, R. P. 2014. High throughput screening of organic residues in archaeological potsherds using direct acidified methanol extraction. *Analytical Methods*, Vol. 6(5), 1330–1340. <https://doi.org/10.1039/C3AY41678J>

Craig, O. E., Allen, R. B., Thompson, A., Stevens, R. E., Steele, V. J., Heron, C. 2012. Distinguishing wild ruminant lipids by GC–C–IRMS. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 26(19), 2359–2364. <https://doi.org/10.1002/rcm.6349>

Craig, O. E., Chapman, J., Figler, A., Patay, P., Taylor, G., Collins, M. J. 2003. 'Milk Jugs' and Other Myths of the Copper Age of Central Europe. *European Journal of Archaeology*, Vol. 6(3), 251–265. <http://dx.doi.org/10.1177/146195710300600303>

Craig, O. E., Chapman, J., Heron, C., Willis, L. H., Bartosiewicz, L., Taylor, G., Whittle, A., Collins, M. 2005. Did the First Farmers of Central and Eastern Europe Produce Dairy Foods?. *Antiquity*, Vol. 79(306), 882–874. <https://doi.org/10.1017/S0003598X00115017>

Craig, O. E., Forster, M., Andersen, S. H., Koch, E., Crombé, P., Milner, N. J., Stern, B., Bailey, G. N., Heron, C. P. 2007. Molecular and isotopic demonstration of the processing of aquatic products in northern European prehistoric pottery. *Archaeometry*, Vol. 49(1), 135–152. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2007.00292.x>

Craig, O. E., Steele, V., Fischer, A., Sönke, H., Søren, H. A., Donohoe, P., Glykou, A., Saul, H., Jones, D. M., Koch, E., Heron, C. 2011. Ancient lipids reveal continuity in culinary practices across the transition to agriculture in northern Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 108(44), 17910–17915. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107202108>

Craig, O. E., Saul, H., Lucquin, A., Nishida, Y., Tache, K., Clarke, L., Thompson, A., Altoft, D. T., Uchiyama, J., Ajimoto, M., Gibbs, K., Isaksson, S., Heron, K., Jordan, P. D. 2013. Earliest evidence for the use of pottery. *Nature*, Vol. 496(7445), 351–354. <https://doi.org/10.1038/nature12109>

Cramp, L. J. E., Evershed, R. P., Eckardt, H. 2011. What was a mortarium used for? Organic residues and cultural change in Iron Age and Roman Britain. *Antiquity*, Vol. 85(330), 1339–1352. <https://doi.org/10.1017/S0003598X00062098>

Cramp, L. J. E., Evershed, R. P., Eckardt, H. 2012. Are you what you grind? A comparison of organic residues from ceramics at two Roman British sites, in: *More than just numbers? The role of science in Roman Archaeology*, Schrüfer-Kolb I. (ed.), Journal of Roman Archaeology Supplementary Series 91, 93–110.

Cramp, L. J. E., Jones, J., Sheridan, A., Smyth, J., Whelton, H., Mulville, J., Sharples, N., Evershed, R. P. 2014. Immediate replacement of fishing with dairying by the earliest farmers of the northeast Atlantic archipelagos. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 281(1780), 1–7. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2372>

Debono Spiteri, C. 2012. *Pottery use at the transition to agriculture in the western Mediterranean: evidence from biomolecular and isotopic characterisation of organic residues in Impressed/Cardial Ware vessels*. Unpublished PhD Thesis, University of York, York.

Debono Spiteri, C., Gillis, R. E., Roffet-Salque, M., Castells Navarro, L., Guilaine, J., Maneng, C., Muntonih, I. M., Saña Seguí, M., Urem-Kotsou, D., Whelton, H. L., Craig, O. E., Vigne, J., Evershed, R. P. 2016. Regional asynchronicity in dairy production and processing in early farming communities of the northern Mediterranean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 113(48), 13594–13599. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607810111>

- Drieu, L. 2017, *Fabrication et usages des poteries durant le Néolithique et la Protohistoire en Europe: les apports de l'archéologie biomoléculaire*, Unpublished PhD Thesis, Université Côte d'Azur, Nice.
- Drieu, L., Horgnies, M., Binder, D., Pétrequin, P., Pétrequin, A.-M., Peche-Quilichini, K., Lachenal, T., Regert, M. 2019, Influence of porosity on lipid preservation in the wall of archaeological pottery, *Archaeometry*, Vol. 61(5), 1081–1096. <https://doi.org/10.1111/arcm.12479>
- Drieu, L., Rageot, M., Wales, N., Stern, B., Lundy, J., Zerrer, M., Gaffney, I., Bondetti, M., Spiteri, C., Thomas-Oates, J., Craig, O. E. 2020, Is it possible to identify ancient wine production using biomolecular approaches?, *STAR: Science and Technology of Archaeological Research*, Vol. 6(1), 16–29. <https://doi.org/10.1080/20548923.2020.1738728>
- Dudd, S. N., Evershed, R. P. 1998, Direct Demonstration of Milk as an Element of Archaeological Economies, *Science*, Vol. 282(5393), 1478–1481. <https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1478>
- Dudd, S. N., Evershed, R. P., Levine, M. A. 2003, Organic residue analysis of lipids in potsherds from the early Neolithic settlement of Botai, Kazakhstan, in: *Prehistoric steppe adaptation and the horse*, Levine M. A., Renfrew C., Boyle K. (eds.), McDonald Institute for Archaeological Research, Cambridge, 45–54.
- Dunne, J., Mercuri, A., Evershed, R., di Lernia, S. 2017a, Earliest direct evidence of plant processing in prehistoric Saharan pottery, *Nature Plants*, Vol. 3(1), 16194. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.194>
- Dunne, J., Evershed, R. P., Heron, C., Brettell, R., Barclay, A., Smyth, J., Cramp, L. 2017b, *Organic Residue Analysis and Archaeology Guidance for Good Practice, Supporting Information*, Historic England, Fort Cumberland. <https://doi.org/10.5284/1108856>
- Dunne, J., Evershed, R. P., Salque, M., Cramp, L., Bruni, S., Ryan, K., Biagetti, S., Di Lernia, S. 2012, First dairying in green Saharan Africa in the fifth millennium BC, *Nature*, Vol. 486(7403), 390–394. <https://doi.org/10.1038/nature11886>
- Evershed, R. P. 1992a, Gas Chromatography of lipids, in: *Lipid Analysis. A Practical Approach*, Hamilton R. J., Hamilton S. (eds.), Oxford University Press, Oxford, 113–151.
- Evershed, R. P. 1992b, Mass spectrometry of lipids, in: *Lipid Analysis. A Practical Approach*, Hamilton R. J., Hamilton S. (eds.), Oxford University Press, Oxford, 263–308.
- Evershed, R. P. 1993, Biomolecular Archaeology and Lipids, *World Archaeology*, Vol. 25(1), 74–93. <https://doi.org/10.1080/00438243.1993.9980229>
- Evershed, R. 2008, Organic Residue Analysis in Archaeology: The Archaeological Biomarker Revolution, *Archaeometry*, Vol. 50(6), 895–924. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2008.00446.x>
- Evershed, R. P., Heron, C., Goad, L. J. 1991a, Epicuticular wax components preserved in potsherds as chemical indicators of leafy vegetables in ancient diets, *Antiquity*, Vol. 65(248), 540–544. <https://doi.org/10.1017/S0003598X00080145>
- Evershed, R. P., Copley, M. S., Dickson, L., Hansel, F. A. 2008a, Experimental evidence for the processing of marine animal products and other commodities containing polyunsaturated fatty acids in pottery vessels, *Archaeometry*, Vol. 50(1), 101–113. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2007.00368.x>
- Evershed, R. P., Dudd, S. N., Copley, M. S., Mukherjee, A. 2002a, Identification of animal fats via compound specific $\delta^{13}\text{C}$ values of individual fatty acids: assessments of results for reference fats and lipid extracts of archaeological pottery vessels, *Documenta Praehistorica*, Vol. XXIX, 73–96. <https://doi.org/10.4312/dp.29.7>
- Evershed, R. P., Heron, C., Charters, S., Goad, L. J. 1991b, The survival of food residues: new methods of analysis, interpretation and application, *Proceedings of the British Academy*, Vol. 77, 187–208.
- Evershed, R. P., Arnot, K. I., Collister, J., Eglinton, G., Charters, S. 1994, Application of isotope ratio monitoring gas chromatography-mass spectrometry to the analysis of organic residues of archaeological origin, *Analyst*, Vol. 119, 909–914. <https://doi.org/10.1039/AN9941900909>
- Evershed, R. P., Stott, A. W., Raven, A., Dudd, S. N., Charters, S., Leyden, A. 1995, Formation of long-chain ketones in ancient pottery vessels by pyrolysis of acyl lipids, *Tetrahedron Letters*, Vol. 36(48), 8875–8878. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)01844-8](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)01844-8)
- Evershed, R., Berstan, R., Grew, F., Copley, M. S., Charmant, A. J. H., Barham, E., Mottram, H. R., Brown, G. 2004, Formulation of a Roman cosmetic, *Nature*, Vol. 432(7031), 35–36. <https://doi.org/10.1038/432035a>
- Evershed, R. P., Dudd, S. N., Charters, S., Mottram, H., Stott, A. W., Raven, A., van Bergen, P. F., Bland, H. A. 1999, Lipids as carriers of anthropogenic signals from prehistory, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, Vol. 354(1379), 19–31. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0357>
- Evershed, R. P., Dudd, S. N., Copley, M. S., Berstan, R., Stott, A. W., Mottram, H. R., Buckley, S. A., Crossman, Z. 2002b, Chemistry of archaeological animal fats, *Accounts of Chemical Research*, Vol. 35(8), 660–668. <https://doi.org/10.1021/ar000200f>
- Evershed, R. P., Payne, S., Sherratt, A. G., Copley, M. S., Coolidge, J., Urem-Kotsu, D., Kotsakis, K., Özdoğan, M., Özdoğan, A. E., Nieuwenhuyse, O., Akkermans, G., Bailey, D., Andeescu, R. R., Campbell, S., Farid, S., Hodder, I., Yalman, N., Özbaşaran, M., Bicačić, E., Garfinkel, Y., Levy, T., Burton, M. M. 2008b, Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding, *Nature*, Vol. 455(7212), 528–531. <https://doi.org/10.1038/nature07180>
- Evershed, R. P., Davey Smith, G., Roffet-Salque, M., Timpson, A., Dickmann, Y., Lyon, M. S., Cramp, L. J. E., Casanova, E., Smyth, J., Whelton, H. L., Dunne, J., Brychova, V., Šoberl, L., Gerbault, P., Gillis, R. E., Heyd, V., Johnson, E., Kendall, I., Manning, K., Marciniak, A., Outram, A. K., Vigne, J., Shennan, S., Bevan, A., Colledge, S., Allason-Jones, L., Amkreutz, L., Anders, A., Arbogast, R., Bălăşescu, A., Bánffy, E., Barclay, A., Behrens, A., Bogucki, P., Carrancho Alonso, Á., Carretero, J. M., Cavanagh, N., Claßen, E., Collado Giraldo, H., Conrad, M., Csengeri, P., Czerniak, L., Debiec, M., Denaire, A., Domboróczki, L., Donald, C., Ebert, J., Evans, C., Francés-Negro, M., Gronenborn, D., Haack, F., Halle, M., Hamon, C., Hülshoff, R., Hett, M., Iriarte, E., Jakucs, J., Jeunesse, C., Johnson, M., Jones, A. M., Karul, N., Kiosak, D., Kotova, N., Krause, R., Kretschmer, S., Krüger, M., Lefranc, P., Lelong, O., Lennicis, E., Logvin, A., Lüth, F., Marton, T., Marley, J., Mortimer, R., Oosterbeek, L., Oross, K., Pavúk, J., Pechtl, J., Pétrequin, P., Pollard, J., Pollard, R., Powlesland, D., Pyzel, J., Raczky, P., Richardson, A., Rowe, P., Rowland, S., Rowlandson, I., Saile, T., Sebők, K., Schier, W., Schmalfuß, G., Sharapova, S., Sharp, H., Sheridan, A., Shevina, I., Sobkowiak-Tabaka, I., Stadler, P., Stäuble, H., Stobbe, A., Stojanowski, D., Tasić, N., van Wijk, I., Vostrovská, I., Vuković, J., Wolfram, S., Zech-Lanz, A., Thomaset M. G. 2022, Dairying, diseases and the evolution of lactase persistence in Europe, *Nature*, Vol. 608(7922), 336–345. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05010-7>
- Friedli, H., Lotscher, H., Oeschger, H., Siegenthaler, U., Stauffer, B. 1986, Ice core record of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of atmospheric CO_2 in the past two centuries, *Nature*, Vol. 324, 237–238. <https://doi.org/10.1038/324237a0>
- Gregg, M. W. 2009, *Organic Residue Analysis and the Earliest Uses of Pottery in the Ancient Middle East*, Unpublished PhD Thesis, University of Toronto, Toronto.
- Gregg, M. W., Slater, G. F. 2010, A new method for extraction, isolation, and transesterification of free fatty acids from archaeological pottery, *Archaeometry*, Vol. 52(5), 833–854. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2010.00518.x>
- Gunstone, F. D. 1992, Introduction, in: *Lipid Analysis. A Practical Approach*, Hamilton R. J., Hamilton S. (eds.), Oxford University Press, Oxford, 1–12.
- Hammann, S., Korf, A., Bull, I. D., Hayen, H., Cramp, L. J. 2019, Lipid profiling and analytical discrimination of seven cereals using high temperature gas chromatography coupled to high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Food Chemistry*, Vol. 282, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.109>
- Hansel, F. A., Copley, M. S., Madureira, L. A. S., Evershed, R. P. 2004, Thermally produced x-(o-alkylphenyl)alkanoic acids provide evidence for the processing of marine products in archaeological pottery vessels, *Tetrahedron Letters*, Vol. 45(14), 2999–3002. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.01.111>
- Hansel, P. A., Evershed, R. P. 2009, Formation of dihydroxy acids from Z-monounsaturated alkenoic acids and their use as biomarkers for the processing of marine commodities in archaeological pottery vessels, *Tetrahedron Letters*, Vol. 50(40), 5562–5564. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.06.114>
- Hansel, F. A., Bull, I. D., Evershed, R. P. 2011, Gas chromatographic mass spectrometric detection of dihydroxy fatty acids preserved in the 'bound' phase of organic residues of archaeological pottery vessels, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 25(13), 1893–1898. <https://doi.org/10.1002/rcm.5038>
- Heron, C., Nemeček, N., Boneld, K. M., Dixon, D., Ottaway, B. S. 1994, The chemistry of Neolithic beeswax, *Naturwissenschaften*, Vol. 81, 266–269. <https://doi.org/10.1007/BF01131579>
- Heron, C., Nilsen, G., Stern, B., Craig, O., Nordby, C. 2010, Application of lipid biomarker analysis to evaluate the function of 'slab-lined pits' in Arctic Norway, *Journal of Archaeological Science*, Vol. 37(9), 2188–2197. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.03.016>
- Heron, C., Andersen, S., Fischer, A., Glykou, A., Hartz, H., Saul, H., Steele, V., Craig, O. 2013, Illuminating the Late Mesolithic: Residue analysis of 'blubber' lamps from Northern Europe, *Antiquity*, Vol. 87(335), 178–188. <https://doi.org/10.1017/S0003598X00048705>
- Heron, C., Shoda, S., Breu Barcons, A., Czebreszuk, J., Eley, Y., Gorton, M., Kirleis, W., Kneisel, J., Lucquin, A., Müller, J., Nishida, Y., Son, J., Craig, O. E. 2016, First molecular and isotopic evidence of millet processing in prehistoric pottery vessels, *Scientific Reports*, Vol. 6, 38767. <https://doi.org/10.1038/srep38767>
- Hofmann, I. C., Hutchison, J., Robson, J. N., Chicarelli, M. I., and Maxwell, J. R. 1992, Evidence for sulphide links in a crude oil asphaltene and kerogens from reductive cleavage by lithium in ethylamine, *Organic Geochemistry*, Vol. 19(4–6), 371–387. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(92\)90006-J](https://doi.org/10.1016/0146-6380(92)90006-J)
- Hulina, M. 2020, *Prehranbene navike neolitičkoga stanovništva na području Hrvatske*, Unpublished PhD Thesis, University of Zagreb, Zagreb.

- Kimpe, K., Jacobs, P. A., Waelkens, M. 2001, Analysis of oil used in Late Roman oil lamps with different mass spectrometric techniques revealed the presence of predominantly olive oil together with traces of animal fat, *Journal of Chromatography A*, Vol. 937(1-2), 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01304-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01304-8)
- McClure, S. B., Magill, C., Podrug, E., Moore, A. M. T., Harper, T. K., Culleton, B. J., Kennett, D. J., Freeman, K. H. 2018, Fatty acid specific $\delta^{13}\text{C}$ values reveal earliest Mediterranean cheese production 7,200 years ago, *PLoS One*, Vol. 13(9), e0202807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202807>
- Meir-Augenstein, W. 2002, Stable isotope analysis of fatty acids by gas chromatography isotope ratio mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 465(1-2), 63–79. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00194-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00194-0)
- Miloglav, I., 2011, *Kasna vučedolska kultura u bosutskoj nizini na temelju keramičkih nalaza*, Unpublished PhD Thesis, University of Zagreb, Zagreb.
- Miloglav, I., Balen, J. 2019, Organic Residue and Vessel Function Analysis from Five Neolithic and Eneolithic Sites in Eastern Croatia, in: *Tracing Pottery-Making Recipes in the Prehistoric Balkans 6th–4th Millennia BC*, Amicone S., Quinn P. S., Marić M., Mirković-Marić N., Radivojević M. (eds.), Archaeopress Publishing Ltd., Oxford 78–95. <https://doi.org/10.2307/ij.ctvndv954.13>
- Mukherjee, A. J., Berstan, R., Copley, M. S., Gison, A. M., Evershed, R. P. 2007, Compound specific stable carbon isotopic detection of pig product processing in British Late Neolithic pottery, *Antiquity*, Vol. 81(313), 743–754. <https://doi.org/10.1017/S0003598X00095703>
- Pecci, A., Clarke, J., Thomas, M., Muslin, J., van der Graaff, I., Toniolo, L., Miriello, D., Crisci, G. M., Buonincontri, M., Di Pasquale, G. 2017, Use and reuse of amphorae. Wine residues in Dressel 2–4 amphorae from Oplontis Villa B (Torre Annunziata, Italy), *Journal of Archaeological Science: Reports*, Vol. 12, 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.02.025>
- Pecci, A., Borgna, E., Mileto, S., Dalla Longa, E., Bosi, G., Florenzano, A., Mercuri, A. M., Corazza, S., Marchesini, M., Vidale, M. 2020, Wine consumption in Bronze Age Italy: combining organic residue analysis, botanical data and ceramic variability, *Journal of Archaeological Science*, Vol. 123, 105256. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2020.105256>
- Rageot, M., Mötsch, A., Schorer, B., Gutekunst, A., Patrizi, G., Zerrer, M., Cafisso, S., Fries-Knoblach, J., Hansen, L., Tarpini, R., Krausse, D., Hoppe, T., Stockhammer, P. W., Spiteri, C. 2019a, The dynamics of Early Celtic consumption practices: A case study of the pottery from the Heuneburg, *PLoS ONE*, Vol. 14(10), e0222991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222991>
- Rageot, M., Mötsch, A., Schorer, B., Bardel, D., Winkler, A., Sacchetti, F., Chaume, B., Della Casa, P., Buckley, S., Cafisso, S., Fries-Knoblach, J., Krausse, D., Hoppe, T., Stockhammer, P., Spiteri, C. 2019b, New insights into Early Celtic consumption practices: Organic residue analyses of local and imported pottery from Vix–Mont Lassois, *PLoS ONE*, Vol. 14(6), e0218001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218001>
- Raven, A. M., van Bergen, P. F., Stott, A. W., Dudd, S. N., Evershed, R. P. 1997, Formation of long-chain ketones in archaeological pottery vessels by pyrolysis of acyl lipids, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, Vol. 40–41, 267–285. [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(97\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(97)00036-3)
- Regert, M. 2011, Analytical strategies for discriminating archaeological fatty substances of animal origin, *Mass spectrometry reviews*, Vol. 30(2), 177–220. <https://doi.org/10.1002/mas.20271>
- Regert, M., Colinart, S., Degrand, L., Decavallas O. 2001, Chemical Alteration and Use of Beeswax Through Time: Accelerated Ageing Tests and Analysis of Archaeological Samples from Various Environmental Contexts, *Archaeometry*, Vol. 43(4), 549–569. <https://doi.org/10.1111/1475-4754.00036>
- Ribechini E., Colombini, M. P., Giachi, G., Modugno, F., Pallecchi, P. 2009, A Multi analytical Approach for the Characterization of Commodities in a Ceramic Jar form Antinoe (Egypt), *Archaeometry*, Vol. 51(3), 480–494. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2008.00406.x>
- Roffet-Salque, M., Lee, M. R. F., Timpson, A., Evershed, R. P. 2016, Impact of modern cattle feeding practices on milk fatty acid stable carbon isotope compositions emphasise the need for caution in selecting reference animal tissues and products for archaeological investigations, *Archaeological and Anthropological Sciences*, Vol. 9(7), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s12520-016-0357-5>
- Roffet-Salque, M., Dunne, J., Altoft, D. T., Casanova, E., Cramp, L. J. E., Smyth, J., Whelton, H., Evershed, R. P. 2017, From the inside out: Upscaling organic residue analyses of archaeological ceramics, *Journal of Archaeological Science: Reports*, Vol. 16, 627–640. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.04.005>
- Roffet-Salque, M., Regert, M., Evershed, R. P., Outram, A. K., Cramp, L. J. E., Decavallas, O., Dunne, J., Gerbault, P., Mileto, S., Mirabaud, S., Pääkkönen, M., Smyth, J., Šoberl, L., Whelton, H. L., Alday-Ruiz, A., Asplund, H., Bartkowiak, M., Bayer-Niemeier, E., Belhouchet, L., Bernardini, F., Budja, M., Cooney, G., Cubas, M., Danaher, E. M., Dimiz, M., Domboróczy, L., Fabbri, C., González-Urquijo, J. E., Guilaine, J., Hachi, S., Hartwell, B. N., Hofmann, D., Hohle, I., Ibáñez, J. J., Karul, N., Kherbouche, F., Kiely, J., Kotsakis, K., Lueth, F., Mallory, J. P., Manen, C., Marciniak, A., Maurice-Chabard, B., McGonigle, A. M., Mulazzani, S., Özdoğan, M., Perić, O. S., Perić, S. R., Petrasch, J., Pétrequin, A., Pétrequin, P., Poensgen, U., Pollard, C. J., Poplin, F., Radi, G., Stadler, P., Stäuble, H., Tasić, N., Urem-Kotsou, D., Vuković, J. B., Walsh, F., Whittle, A., Wolfram, S., Zapata-Peña, L., Zoughlami, J. 2015, Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers, *Nature*, Vol. 527(7577), 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature15757>
- Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., Evershed, R. P. 2013, Earliest Evidence for Cheese Making in the Sixth Millennium BC in Northern Europe, *Nature*, Vol. 493(7433), 522–525. <https://doi.org/10.1038/nature11698>
- Salque, M., Radi, G., Tagliacozzo, A., Pino Uria, B., Wolfram, S., Hohle, I., Stäuble, H., Hofmann, D., Whittle, A., Pechtl, J., Schade-Lindig, S., Eisenhauer, U., Evershed, R. P. 2012, New insights into the Early Neolithic economy and management of animals in Southern and Central Europe revealed using lipid residue analyses of pottery vessels, *Anthropozoologica*, Vol. 47(2), 45–63. <https://doi.org/10.5252/az2012n2a4>
- Sealy, J. 2001, Body tissue chemistry and palaeodiet, in: *Handbook of Archaeological Sciences*, Brothwell D. R., Pollard A. M. (eds.), John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 269–279.
- Smyth, J., Evershed, R. P. 2015, Milking the megafauna: Using organic residue analysis to understand early farming practice, *Environmental Archaeology*, Vol. 21, 214–229. <https://doi.org/10.1179/1749631414Y.00000000045>
- Spangenberg, J. E., Jacomet, S., Schibler, J. 2006, Chemical analyses of organic residues in archaeological pottery from Arbon Bleiche 3, Switzerland – evidence for dairying in the late Neolithic, *Journal of Archaeological Science*, Vol. 33(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.05.013>
- Stacey, R. J. 1999, *Lipid residues from Late Iron Age pottery: patterns and processes in their absorption and preservation*, Unpublished PhD Thesis, University of Bradford, Bradford.
- Stacey, R. J. 2009, Organic residues: Origins, Analysis and Scope – An Overview for the Archaeological Ceramicist, *The Old Potter's Almanack*, Vol. 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.11588/opa.2009.1.11811>
- Stacey, R. J. 2011, The composition of some Roman medicines: evidence for Pliny's Punic wax?, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 401(6), 1749–1759. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5160-7>
- Stern, B. 2011, Analiza uzoraka metodom plinske kromatografije-masene spektrometrije / Analysis of samples by Gass Chromatography-Mass spectrometry, in: J. Balen, *Đakovo Franjevac. Kasno bakrenodobno naselje / Đakovo Franjevac. Late Eneolithic settlement*, Katalozi i monografije 7, Arheološki muzej u Zagrebu, Zagreb, 148–155.
- Stojanovski, D., Živaljević, I., Dimitrijević, V., Dunne, J., Evershed, R. P., Balasse, M., Dowle, A., Hendy, J., McGrath, K., Fischer, R., Speller, C., Jovanović, J., Casanova, E., Knowles, T., Balj, L., Naumov, G., Putica, A., Starović, A., Stefanović, S. 2020, Living off the land: Terrestrial-based diet and dairying in the farming communities of the Neolithic Balkans, *PLoS ONE*, Vol. 15(8), e0237608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237608>
- Šoberl, L., Horvat, M., Žibrat Gašparič, A., Sraka, M., Evershed, R., Budja, M. 2014, Neolithic and Eneolithic activities inferred from organic residue analysis of pottery from Mala Triglavca, Movernova vas and Ajdovska jama, Slovenia, *Documenta Praehistorica*, Vol. XLI, 149–179. <https://doi.org/10.4312/dp.41.9>
- Štraus, B., Petrik, J. 2009, Lipidi i lipoproteini, in: *Štrausova medicinska biokemija*, Čvorišćec D., Čepelak I. (eds.), Medicinska naklada, Zagreb, 124–161.
- Tulloch, A. P. 1970, The composition of beeswax and other waxes secreted by insects, *Lipids*, Vol. 5, 247–258.
- Urem-Kotsou, D., Mitkidou, S., Dimitrakoudi, E., Kokkinos, N., Ntinou, M. 2018, Following their tears: Production and use of plant exudates in the Neolithic of North Aegean and the Balkans, *Quaternary International*, Vol. 496, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2018.10.027>
- Whelton, H. L., Hammann, S., Cramp, L. J. E., Dunne, J., Roffet-Salque, M., Evershed, R. P. 2021, A call for caution in the analysis of lipids and other small biomolecules from archaeological contexts, *Journal of Archaeological Science*, Vol. 132, 105397. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2021.105397>

Summary

Research of the organic residues absorbed in ceramics is an important part of the research of everyday lives of archaeological populations, especially their diet and the ways in which ceramic vessels were used. Organic residues are quite common in pottery and provide information that would otherwise be lost (Gregg 2009; Stacey 2009).

Organic residue analysis (ORA) is now almost routinely carried out as part of archaeological research, and using modern analytical techniques and instruments, even the smallest traces of organic residues can be detected. So far, a whole range of different substances has been discovered, such as animal and dairy fats and vegetable oils and waxes, beeswax, resins, marine mammal and fish fats etc.

Since analyses of this type are still quite new in our country and there is no sampling system that could be applied uniformly at all sites, I provide a brief overview of the research and methodology and a proposal for the sampling procedure for the organic residue analysis with the accompanying form.

The use of different chemical compounds and their decay products for the detection and identification of certain organic residues (e.g. plant – cereal, millet, leafy plant, animal – ruminant, non-ruminant, fish) is based on the concept of archaeological biomarkers (Evershed 2008). Biomarkers can be different molecules (lipids, proteins, carbohydrates, DNA, amino acids etc.), and their chemical structure and distribution in archaeological material is compared to modern organisms.

Organic residues can be preserved in three forms (Evershed 2008, Gregg 2009; Stacey 2009): as physical residue of the vessels' content, as visible remains on the inner or outer walls of the vessel – e.g. carbonized residue of food, glue, impregnation, decoration or soot, which often consists of resins, waxes, or bitumen (Evershed 2008) – and as invisible residues absorbed in the ceramic matrix (most often lipids). The last type of organic residue is the most common and can be preserved in more than 80% of vessels (Evershed 2008; Stacey 2009).

The organic residues in question are created by the absorption of organic matter (e.g. food) into the porous walls of pottery vessels during various activities. Their preservation depends on many factors, such as environment and geographical conditions, soil acidity, temperature, moisture, the presence of oxygen and microbes, and the vessel itself and the way it was made and used. The most favourable conditions are dry (desert) or very humid (rivers, lakes), those without oxygen and acidic soil (Copley et al. 2005; Drieu 2017; Gregg, Slater 2010; Smyth, Evershed 2015). As for temperatures, the most favourable climates are those cold and humid (Debono Spiteri 2012).

The preservation of lipids is also greatly influenced by the ways the vessels were used, how long and how intensively, and how they were treated after excavation (Evershed 2008; Stacey 2009).

The preservation of organic residues is also affected by the vessels themselves – the material and the way they were made. Experiments by L. Drieu (2017; Drieu et al. 2019) showed that ceramic vessels with low porosity absorb less lipids, but when lipids are absorbed into such vessels, they are better preserved because microorganisms have a harder time penetrating through them. In an environment without the presence of oxygen, with little activity of microorganisms, the most lipids are preserved in vessels with a higher porosity and a smoothed (not polished) surface.

In short, the preservation of lipids in a ceramic vessel is the result of everything that happened to that vessel from the time of its production to the time of the analysis (e.g. Drieu 2017; Roffet-Salque 2018; Stacey 1999).

In the context of ORA, the most commonly found organic compounds are lipids because they are preserved better, longer, and more often than other biomolecules – e.g. proteins, carbohydrates, or DNA (Debono Spiteri 2012; Evershed 1993).

Lipids are a large group of chemical compounds that have a common property of being hydrophobic (they are not soluble in water) and soluble in organic solvents (e.g. in hydrocarbons, chloroform, benzenes, ethers, alcohols). They consist of atoms of carbon – C, hydrogen – H (and oxygen – O), and can be grouped into simple lipids that contain only fatty acids and alcohol and complex lipids (Štraus, Petrik 2009).

In living beings, the largest proportion (95%) of lipids is found in the form of triacylglycerols (or triglycerides), which consist of a glycerol molecule linked to three fatty acids. This makes fatty acids the most important compounds in organic residue analysis.

The most common fatty acids in nature, and those most important for analyses in archaeology, are fatty acids with 16 (C_{16:0} – palmitic acid) and 18 (C_{18:0} – stearic acid) carbon atoms (Evershed 2008).

Aside from acylglycerols (tri-, di-, and mono-kinds) and fatty acids (that could be, for example, saturated or unsaturated, straight, ring or branched chained, paired with hydroxy groups or paired together to form diacids), other important compounds are e.g. n-alcohols, n-alkanes, wax esters, sterols, terpenes, ketones.

There are several lipid extraction methods; their use depends on the research question, the expected results, and the plans for further analysis, and may vary somewhat between different laboratories (e.g. Correa Ascencio, Evershed 2014; Evershed et al. 1991b; Evershed 2008; Gregg 2009; Regert 2011).

The extraction methods routinely used today are solvent extraction (e.g. Evershed et al. 1991b; 2001; Evershed 2008) and direct acid extraction (Correa Ascencio, Evershed 2014). The difference between these methods is that each of them targets different types of molecules, so sometimes one sample needs to be subjected to several different extractions.

Before the actual analysis on the instruments, in order not to lose data, it is necessary to make the molecules thermally stable and sufficiently reactive by what is called derivatization.

The main analytical methods used for lipid analysis are: gas chromatography (GC), high temperature GC (HT-GC); gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS); gas chromatography – combustion – isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS).

Gas chromatography (GC) is primarily used for the separation of molecules and their quantification, mass spectrometry shows the structure of compounds and identifies them, and if there is a sufficient amount of $C_{16:0}$ and $C_{18:0}$ fatty acids in the sample, an isotope analysis can be performed, and it shows the origin of the sample. The results are compared with the known values for certain animal species obtained from archaeological and modern reference material, and are interpreted depending on the archaeological context.

Some of the research in which ORA has been applied is the research of the diet of archaeological populations and their survival strategies, the way certain types of vessels are made and used, as well as their decoration and repairs, which in a broader sense also implies research into technological changes and resource utilization; some research focuses on the relationship between the shape, that is, the type of vessel and its content, the function of vessels and the possible specialization in their use, which can be within one site, between different sites, over time; preparing food in containers, rituals, cosmetic and medicine use; trade and exchange of resources and goods. Fatty acids from organic residues can also be radiocarbon dated, which directly dates the time of use of the vessel (Casanova et al. 2020).

The first step of any research is the project plan, which should include a clearly defined question and how and in what way ORA will help answer it. The sampling strategy (sample size, types of vessels, the context from which the samples are collected – e.g. house, grave), types of extraction (there are different types of extraction for e.g. animal fats, wine, wax), and methods of analysis differ depending on what the question is (e.g. if we are interested in milk, animal fat, fish), whether an isotope analysis is planned (to distinguish between ruminants, non-ruminants, milk) etc.

The sampling strategy depends mostly on the question that is being asked, but also on the type of site and the project plan. For general questions (e.g. about diet), about 20–30 samples are usually enough (each of about 2 grams of ceramic powder or a fragment the size of at least a 2-euro coin), but sometimes fewer samples are enough (e.g. when investigating an individual grave, an individual feature, or a specific type of vessel at a site), and sometimes many more are needed.

In order to avoid contamination after the excavation as much as possible, it would be ideal to start sampling during the excavation; any handling of ceramic sherds – washing, packaging in plastic bags, gluing, frequent touching and inspecting, and finally conservation – can be a source of contamination.

When taking a sample during the excavation, a dry pottery sherd should be taken (if it is in wet soil,

it has to be dried), wrapped in aluminium foil or acid-free paper, and put in a bag or box. When handling it, gloves should be used (or clean washed hands) to avoid contamination as much as possible, especially with sunscreen or hand creams.

Washed sherds can also be sampled, but in that case more care should be taken to thoroughly clean them before powdering. Reconstructed vessels can also be used.

Furthermore, it is important to choose the sherd with the greatest potential for lipid preservation. Experiments have shown that in most cases lipids are preserved at the top of the vessel, especially when cooking fatty foods, while baking distributes them throughout the pan, but the highest concentration is still at the top (Stacey 2009; Charters et al. 1993).

In order to obtain the best and most accurate results, it is necessary to have as much contextual information as possible – the location and year of research, the time period, the type of site (e.g. settlement, cemetery), the context of the find (e.g. pit, house, grave), the type and acidity of the soil, the vegetation on the site and archaeobotanical data, the animal species, the type and part of the vessel, its texture, decoration; if the vessel was reconstructed, it is important to know which chemicals were used.

It is also important to note if an additional specific type of extraction is required (e.g., for wine).

The person doing the analysis must take all the necessary steps to ensure that the sample is not additionally contaminated in the laboratory, and to obtain good chromatograms; the final interpretation should always take into account the entire context: the type of site, what plants or animals were present, which were the possible contaminants etc. In short, if something in the Croatian Neolithic looks like a penguin, but it could also possibly be a pig, it is most likely not a penguin.

ORA has great potential for use for all the pottery from all archaeological periods and can answer a great range of questions (some of which are mentioned in the text); new and better methods, biomarkers and its uses, are being developed, expanded, and improved every day; also, it is becoming more and more available at different places, with more experts and hopefully lower prices.

However, the first step is to collect the samples, avoid contamination, and provide adequate information. This paper proposes a form to be used for the sampling for ORA from Croatian sites.