

## 議論 (Discussion)

# 三芳香環ステロイドの同定：安藤・沢田 (2012) 「堆積岩中における A 環メチルステロイド (ステランおよび三芳香環ステラン) の GC/MS 解析」\* の再検討

安藤 卓人 <sup>\*\*</sup>,<sup>a</sup>・沢田 健 <sup>\*\*\*</sup>

(2017 年 9 月 29 日受付, 2017 年 12 月 16 日受理)

## 1. はじめに

渦鞭毛藻 (dinoflagellate) はアルベオラータ上門 (Alveolata) に属し, 現在の水圏における主要な基礎生産者であり, 約 2400 種のうちおよそ半数が独立栄養性であるとされる (Gómez, 2012)。炭素数 30 (C<sub>30</sub>) の 4-メチルステロイドであるジノステロイド (dinosteroid) は多くの種類の渦鞭毛藻が生合成することから, 渦鞭毛藻バイオマーカーとして用いられてきた。最近になって, ジノステロール (dinosterol; 4 $\alpha$ , 23, 24R-trimethyl-5 $\alpha$ -cholest-22E-en-3 $\beta$ -ol) を生合成する種が含まれるのは, 渦鞭毛藻の中でもジムノディニウム科 (Gymnodiniaceae) とそれより派生的な鎧版 (thecal plate) を持つグループ (Gonyaulacales, Peridinales など) であり, その他の鎧版を持たない渦鞭毛藻と他のアルベオラータは生合成できないことが明らかになってきている (Leblond et al., 2012; Janouškovec et al., 2017)。また, 羽状目珪藻 *Navicula jeffreyi* の培養試料からもジノステロイドが検出されている (Volkman et al., 1993) が, 他の *Navicula* 属を含めたその他の生物種からは検出例はない (e. g., Rampen et al., 2010)。

一方で, ジノステロイド以外の 4-メチルステロイドや 23 位にメチル基を伴うステロイドは, ハプト藻や珪藻などの渦鞭毛藻以外の主要な海洋基礎生産も生合成するため (e. g., Volkman et al., 1990), 渦鞭毛藻のみのバイオマーカーとは厳密にはいえない。したがって, 渦鞭毛藻や円石藻, 珪藻などの微細藻類の進化やステロイド生合成の変遷を研究する上で, ジノステロイドは極めて重要な脂質であるといえるが, 堆積物 (岩) 試料の抽出物を用いて過去の渦鞭毛藻生産を理解するには, 他のメチルステロイドとジノステロイドを正確に分離する必要がある。しかし, よく研究対象になるメチルステランは異性体が多く存在し, その中からジノステランを同定することは GC/MS のマススペクトルのみからだと困難である (安藤・沢田, 2012)。そのため, 本研究では高熟成の堆積岩中にも多く含まれるステロイドで, より異性体が少なく比較的的同定しやすい三芳香環ステロイドを対象とした。

本論では, 2012 年に本誌で公表された安藤・沢田 (2012) における三芳香環ステロイドの同定を Ando et al. (2017) をもとに新たな方法を提案するとともに, 三芳香環ステロイドの同定法を整理する。また, 三芳

---

\*Identification of triaromatic steroids: Further refinement of “GC/MS analyses of A-ring methylsteroids (sterane and triaromatic sterane) in sedimentary rocks” by Ando and Sawada

\*\*北海道大学 北極域研究センター 雪氷圏研究グループ  
〒001-0021 札幌市北区北 21 条西 11 丁目 北キャンパス総合研究棟 2 号館 2 階  
Takuto Ando: Arctic research center, Hokkaido University  
N21W11, Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan

\*\*\*北海道大学 大学院理学研究院 地球惑星科学部門  
〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目  
Ken Sawada: Department of Earth and Planetary Sciences, Faculty of Science, Hokkaido University, N10W8, Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan

<sup>a</sup>Corresponding author. e-mail: tact@arc.hokudai.ac.jp (安藤卓人)

香環メチルステロイドはマスフラグメントからの同定が困難であり、過去の論文においても同定基準が曖昧であった。安藤・沢田 (2012) においても既存の曖昧な報告例を参考にしており、Ando et al. (2017) の論文投稿時の査読過程において、より正確な同定ができたので、本論では同定法の「再検討」を行なうこととした。

## 2. 三芳香環ステロイドについて

安藤・沢田 (2012) では「三芳香環ステラン (triaromatic sterane)」と表記しているが、'-ane' は飽和炭化水素につく接尾語なので、「三芳香環ジノステロイド (triaromatic steroid)」とすべきだとの指摘を、Ando et al. (2017) の査読時に受けた。そのため、本論では「三芳香環ジノステロイド」という語を用いるとともに、和文表記でも今後は、「一芳香環ステラン」、「三芳香環ステラン」ではなく「一芳香環ステロイド」、「三芳香環ステロイド」といった用語を使うべきであることを提案する。また、三芳香環ステロイドは芳香族化の過程でメチル基を1つ失うので、炭素数が元々のステロイドより1小さいため、側鎖の炭素番号は1ずつ小さくなるべきである。しかし、これに関しても同様に査読中に指摘され、不斉炭素がある20位と24位の数字が1小さくなる(19位, 23位)ように表記はしていない(Appendix)。この結果、19位の炭素は三芳香環ステロイドには存在しないことになる。

## 3. 中極性カラムの使用

三芳香環ステロイドは熟成度の高い堆積岩において、抽出物の芳香族画分として普遍的に含まれる成分であるものの、マススペクトル上では側鎖の開裂によるフラグメント由来の基準ピーク ( $m/z$  231, 245) と分子イオンピーク以外のスペクトルはほぼ検出できないため、異性体に関して、スペクトルから同定をすることはほぼ不可能といえる。Moldowan et al. (1996) では、有機合成した三芳香環ステロイドを用いることで、三芳香環ジノステロイド (triaromatic dinosteroid) を同定し、カンブリア系から白亜系の根源岩を用い、ジノステロイド組成の比較を行なった。その結果、三芳香環ジ

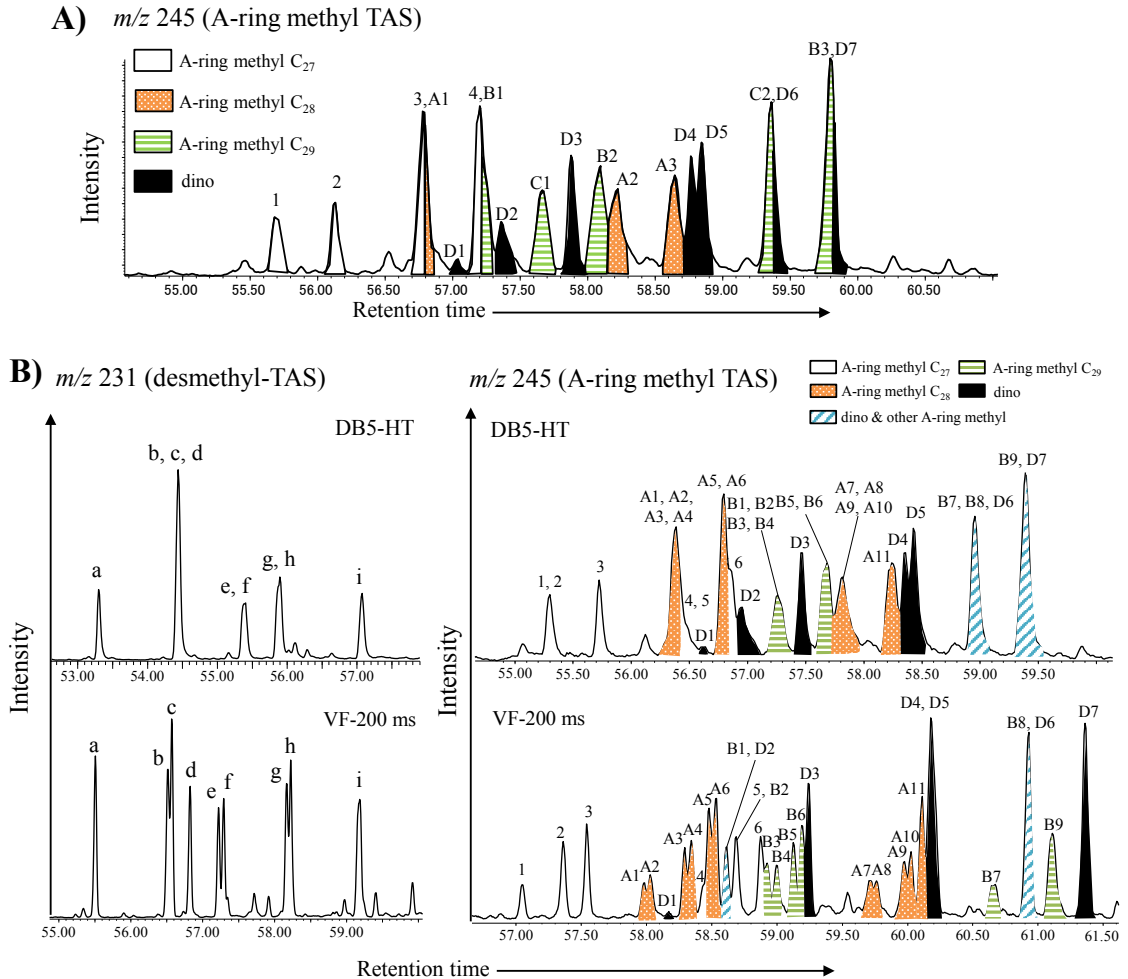
ノステロイドの割合はアクリタークと渦鞭毛藻シストの種数の変動と類似し、特にアクリタークの種数がデボン紀以降に減少する傾向と類似することが示され、古生界に産出するアクリタークの一部が渦鞭毛藻シストである可能性を示唆した。

Fig.1では、安藤・沢田 (2012) における三芳香環ステロイドの誤った解釈が含まれる同定 (A) と Ando et al. (2017) におけるより正確な同定 (B) をマスクロマトグラム上で比較した。Table1にはそれらの同定の詳細、Fig.2には先行研究における同定の例 (Ma et al., 2008; Brocks et al., 2016) を示している。Ando et al. (2017) の手法において、特筆すべきは、二種類のカラム (DB-5HT および VF-200 ms) を用いて同定を行なった点にある。VF-200 ms は中極性のカラムであり、アルケノンの分離能が極めて良いことが近年報告されている (Longo et al., 2013)。一般的に中極性カラムは高温に弱く、GC/MS 測定での分離能は良くないが、250℃以上の高温で使用が可能であり、特にメチル基の位置の異なる異性体の分離に適しており、そのような異性体が多い芳香族画分において、無極性カラムと合わせて従来の分離と比較することで、化合物同定がより正確になることが期待できる。

## 4. 三芳香環ステロイドの同定法

安藤・沢田 (2012) では、Ma et al. (2008) をもとにA環メチル三芳香環ステロイドのうち、炭素数27のステロイド (methyltriaromatic cholesterol) を4種類、炭素数28のステロイドを3種類 (methyltriaromatic 24-methylcholesterol), ジノステロイドを除く炭素数29のステロイド (methyltriaromatic 24-ethylcholesterol) を5種類同定している。堆積物 (岩) では、三芳香環ステロイドのメチル基の位置は2位, 3位, 4位が主要であり、それぞれに20位のS, R異性体があるので、6種の異性体が検出されるはずである。

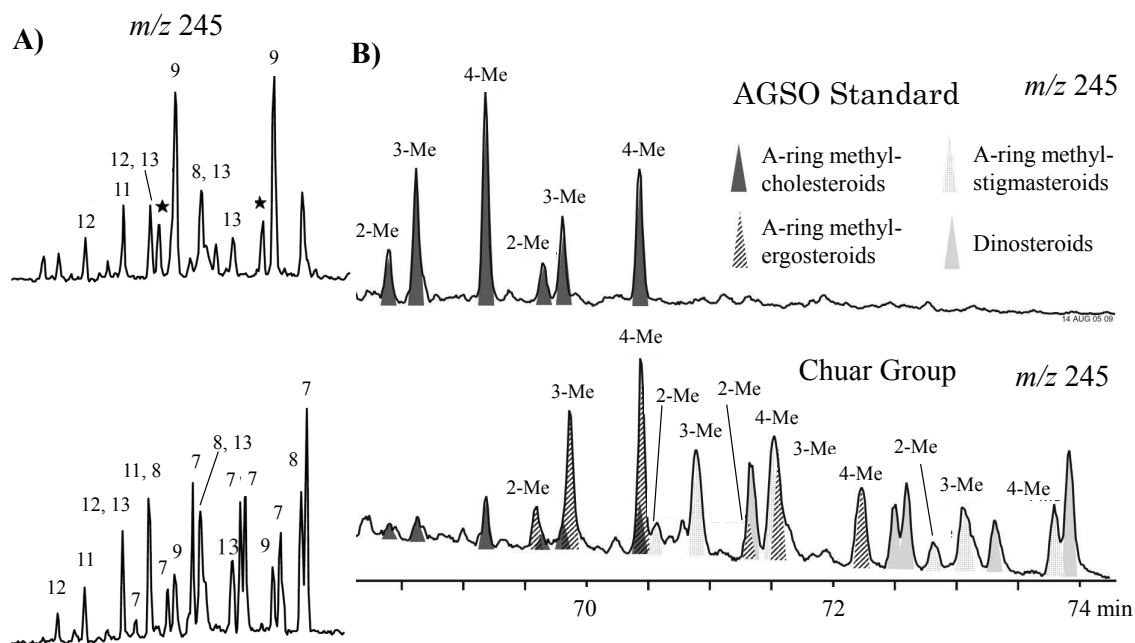
Ando et al. (2017) における VF-200 ms を用いた分析では、6種類の異性体の分離が改善され、Brocks et al. (2016) の最新の論文を参考に同定を行なった結果、規則的に溶出していることが分かった。溶出順は2位→3位→4位であり、異性体ごとの保持時間の間隔と順序を保ったまま、S体の



**Fig. 1.** Mass fragmentograms ( $m/z$  231 and 245) showing desmethyl and A-ring methyl TA steroid described at A) Ando and Sawada (2012) and B) Ando et al. (2017) in aromatic hydrocarbon fractions using a DB-5HT and VF-200 ms from the sample of the Paquier level, Moriez, Vocontian Basin, SE France.

あとに R 体が溶出する。また、炭素数を分子イオンから決定したところ、炭素数ごとにこれらの 6 種の異性体が規則的に溶出していることが、クロマトグラム上からも容易に確認できた (Fig. 1B)。すなわち、炭素数 27 の化合物については、1 と 4 (20S 体と 20R 体、以下同様)、2 と 5、3 と 6、炭素数 28 では A1+A2 と A7+A8、A3+A4 と A9+A10、A5+A6 と A11、炭素数 29 では B1+B2 と B7、B3+B4 と B8、B5+B6 と B9 がそれぞれ 2-メチル、3-メチル、4-メチルの異性体に対応している。さらに、VF-200 ms を用いると、従来分離されていなかった 24 位の S, R 異性体も区別できる可能性を指摘した。

これは、24 位にメチル基がない炭素数 27 の三芳香環メチルステロイドを除く化合物でダブルピークが多く見られることから推定した。同様なダブルピークは、メチル基を持たない三芳香環ステロイド (desmethyltriaromatic steroid; Fig. 1B 左図,  $m/z$  231) でもみられる。以上の VF-200 ms の結果をもとに、再び DB-5HT のデータを見直したところ、2-メチルと 3-メチルのステロイドが完全に被っていると想定すると、溶出順に矛盾がないように化合物同定ができた。すなわち、三芳香環ジノステロイド以外のメチルステロイド (2-, 3-メチルステロイドの共溶出ピークと 4-メチルステ



**Fig. 2.** Mass fragmentograms showing A-ring methyl triaromatic steroid ( $m/z$  245) described at A) Ma et al., 2008 (7=triaromatic dinosteroid; 8=4-methyl-24-ethyltriaromatic cholesterol; 9=3-methyl-24-ethyltriaromatic cholesterol; 11=4-methyltriaromatic cholesterol; 12=3-methyltriaromatic cholesterol; 13=3-methyl-24-methyltriaromatic cholesterol) and B) Brocks et al., 2016 (1) from the sample of the Chuar Group and (2) the AGSO Standard.

ロイドのピークの2種類、それぞれに20S, 20Rの異性体と炭素数27, 28, 29の化合物があるので全12ピーク)のすべてが、DB-5HTを用いて分離を行なった場合でも保持時間から同定できた。

三芳香環ジノステロイドについては、Brocks et al. (2016) などの先行研究をもとに、異性体同士の保持時間の関係性を参考に、 $m/z$  245のマスフラグメントグラム上における分子イオンピークが386(炭素数29)である化合物ピークのうち、methyltriaromatic 24-ethylcholesteroid 異性体(B1~B9)以外のピーク(D1~D7)が、三芳香環ジノステロイドであるとして、同定を行なった。methyltriaromatic 24-ethylcholesteroidの6つの異性体と三芳香環ジノステロイド以外にも炭素数29の三芳香環ステロイドは存在する可能性もあるが、Brocksらも同様の手法で三芳香環ジノステロイドを同定しており、Ma et al. (2008) などの先行研究と同様に7種類のジノステロイド異性体を同定できている。これらの三芳香環ジノステロイド異性体の同定に関しては、安藤・沢田 (2012) と Ando et al. (2017) で、ほとんど変化がない。一方、2種類のカラム

を用いたところ、DB-5HTではピークD6, D7の三芳香環ジノステロイド異性体、VF-200msではピークD2, D6の異性体が他の三芳香環メチルステロイドと共溶出していることがわかった (Fig. 1B)。特に、どちらのカラムを用いても3-methyltriaromatic 24-ethylcholesteroid (B8)のピークがD6のピークと共溶出していることが明らかになった。

### 5. 三芳香環ステロイド指標 (TADS)

Ando et al. (2017) では、ここまでのA環メチル三芳香環ステロイドの同定をもとに、三芳香環ステロイドを用いて、渦鞭毛藻の基礎生産への寄与を示す三芳香環ジノステロイド指標 (TADS) とその派生版のTADS'を提案している。

$TADS = 100 \times [TA \text{ dinosteroids except D6}] / ([C_{26}\text{-}C_{27} \text{ TA steroids}] + [A\text{-ring methyl } C_{27}\text{-}C_{28} \text{ TA steroids}] + [TA \text{ dinosteroids except D6}])$

$TADS' = 100 \times [TA \text{ dinosteroids} + B8] / ([C_{26}\text{-}C_{27} \text{ TA steroids}] + [A\text{-ring methyl } C_{27}\text{-}C_{28} \text{ TA steroids}] + [TA \text{ dinosteroids} + B8])$

**Table 1.** Assignment of desmethyl and A-ring methyl triaromatic steroid labelled in Fig. 1.

Ando et al. (2017)							Ando and Sawada (2012)	
Peak	Compound name	Formula	MW	RI <sup>†</sup> -DB5	Reference*	RI <sup>†</sup> -VF	Peak	Compound name
a	TA 20S cholesterolid	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub>	344	2881	1, 2	3221		
b	TA 20S 24-methylcholesteroid isomer A	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	2952	1, 2	3295		
c	TA 20S 24-methylcholesteroid isomer B	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	2952	1, 2	3299		
d	TA 20R cholesterolid	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub>	344	2952	1, 2	3319		
e	TA 20S 24-ethylcholesteroid isomer A	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3011	1, 2	3349		
f	TA 20S 24-ethylcholesteroid isomer B	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3011	1, 2	3355		
g	TA 20R 24-methylcholesteroid isomer A	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	3043	1, 2	3424		
h	TA 20R 24-methylcholesteroid isomer B	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	3043	1, 2	3430		
i	TA 20R 24-ethylcholesteroid	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3184	1, 2	3515		
1	2-methyl TA 20S cholesterolid	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	2998	2	3336	1	3-methyltriaromatic cholestane 19S
2	3-methyl TA 20S cholesterolid	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	2998	2, 3	3360		
3	4-methyl TA 20S cholesterolid	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	3028	2, 3	3374	2	4-methyltriaromatic cholestane 19S
4	2-methyl TA 20R cholesterolid	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	3069	2	3449		
5	3-methyl TA 20R cholesterolid	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	3069	2, 3, 4	3472	3	3-methyltriaromatic cholestane 19R
6	4-methyl TA 20R cholesterolid	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub>	358	3097	2, 3, 5	3489	4	4-methyltriaromatic cholestane 19R
A1	2-methyl TA 20S 24-methylcholesteroid isomer A	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3069	2	3407	A1	C <sub>28</sub> A-ring methyltriaromatic cholestane isomer
A2	2-methyl TA 20S 24-methylcholesteroid isomer B	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3069	2	3413		
A3	3-methyl TA 20S 24-methylcholesteroid isomer A	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3069	2, 3	3436		
A4	3-methyl TA 20S 24-methylcholesteroid isomer B	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3069	2, 3	3441		
A5	4-methyl TA 20S 24-methylcholesteroid isomer A	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3097	2	3454	B1	4-methyl-23-ethyltriaromatic cholestane isomer
A6	4-methyl TA 20S 24-methylcholesteroid isomer B	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3097	2	3458		
A7	2-methyl TA 20R 24-methylcholesteroid isomer A	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3163	2	3561	A2	C <sub>28</sub> A-ring methyltriaromatic cholestane isomer
A8	2-methyl TA 20R 24-methylcholesteroid isomer B	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3163	2	3565		
A9	3-methyl TA 20R 24-methylcholesteroid isomer A	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3163	2, 3	3582		
A10	3-methyl TA 20R 24-methylcholesteroid isomer B	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3163	2, 3	3587		
A11	4-methyl TA 20R 24-methylcholesteroid	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub>	372	3192	2, 3	3594	A3	C <sub>28</sub> A-ring methyltriaromatic cholestane isomer
B1	2-methyl TA 20S 24-ethylcholesteroid isomer A	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3127	2	3467	C1	3-methyl-23-ethyltriaromatic cholestane isomer
B2	2-methyl TA 20S 24-ethylcholesteroid isomer B	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3127	2	3469		
B3	3-methyl TA 20S 24-ethylcholesteroid isomer A	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3127	2, 3	3493		
B4	3-methyl TA 20S 24-ethylcholesteroid isomer B	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3127	2, 3	3500		
B5	4-methyl TA 20S 24-ethylcholesteroid isomer A	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3156	2, 3	3511	B2	4-methyl-23-ethyltriaromatic cholestane isomer
B6	4-methyl TA 20S 24-ethylcholesteroid isomer B	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3156	2, 3	3516		
B7	2-methyl TA 20R 24-ethylcholesteroid	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3239	2, 3, 4	3646	C2	3-methyl-23-ethyltriaromatic cholestane isomer
B8	3-methyl TA 20R 24-ethylcholesteroid	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3239	2, 3, 4	3672		
B9	4-methyl TA 20R 24-ethylcholesteroid	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3268	2, 3, 5, 6	3690	B3	4-methyl-23-ethyltriaromatic cholestane isomer
D1	TA dinosteroid isomer A	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3086	3	3422	D1	triaromatic dinosterane isomer
D2	TA dinosteroid isomer B	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3200	3, 7	3465	D2	triaromatic dinosterane isomer
D3	TA dinosteroid isomer C	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3142	2, 3, 7	3520	D3	triaromatic dinosterane isomer
D4	TA dinosteroid isomer D	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3200	2, 3, 7	3600	D4	triaromatic dinosterane isomer
D5	TA dinosteroid isomer E	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3205	2, 3, 7	3600	D5	triaromatic dinosterane isomer
D6	TA dinosteroid isomer F	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3241	2, 3	3672	D6	triaromatic dinosterane isomer
D7	TA dinosteroid isomer G	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub>	386	3271	2, 3	3713	D7	triaromatic dinosterane isomer

#: Kovats index. See text.

\*: Reference of identification ; 1: Barbanti et al. (2011), 2: Brocks et al. (2016); 3: Zhang et al. (2000); 4: Lichtfouse et al. (1990); 5: Ludwig et al.(1981); 6: Stoilov et al. (1994); 7: Shetty et al. (1994)

TA: triaromatic

式中の分子から前述の 3-methyltriaromatic 24-ethylcholesteroid との共溶出ピーク (B8+D6) を含んだ場合 (TADS) と除いた場合 (TADS') では、大きな変化はないものの、3-メチルステロイドが多く含まれる試料では、TADS' を用いた場合に、渦鞭毛藻の基礎生産への寄与を過大評価してしまう可能性がある。南東フランス白亜紀 OAE 層準の試料においては、OAE1a (Goguel) 層準試料では共溶出していない B8 以外の 3-メチル三芳香環ステロイドも多く検出されていることから、B8 と D6 の

共溶出ピークのうち B8 の寄与が他の層準の試料に比べて大きいと考えられる。そのため、Ando et al. (2017) には詳細な値は示されているが、実際に TADS' と TADS の差が大きくなる (Goguel 試料でそれらの値の差の平均が 3.7 に対して他の試料では 2.7)。

最近の分子系統学的な観点からは、古生代におけるジノステロイド合成種は必ずしも渦鞭毛藻ではないと説明されている (Janouškovec et al., 2017)。これらの説を確認するためには、地質時代におけ

る三芳香環ジノステロイド組成と渦鞭毛藻シストやアクリタークを含めた海生パリノモルフ(有機質微化石; palynomorph) 組成の再検討が必要である。しかし, Moldowan et al. (1996) 以降, 三芳香環ジノステロイドについて, 特に古生物学的な観点からの議論はほとんどされていない。今後, 本論や Ando et al. (2017) の同定法を用いて, より多くの堆積岩で三芳香環ステロイドの分析が行われることで, 渦鞭毛藻の進化史だけでなく海洋基礎生産者の進化史をより詳細に理解できるものと期待される。また, 三芳香環ステロイドのより詳細な同定は, 今後発展すると期待される無極性と中(あるいは高)極性の2次元カラム分析(GC×GC/MSやGC-GC/MS)を用いたステロイド異性体の同定にも役に立つであろう。

## 6. まとめ

安藤・沢田(2012)の三芳香環ステロイドの同定を再検討し, 異性体の区別が困難である三芳香環ステロイドについて, より詳細かつ信頼性の高い同定法を提案した。特に, Ando et al. (2017)で報告した無極性カラムと中極性カラムの併用は, 異性体が多く存在するステロイドの分離・同定に有効である。今後, 地質時代における海洋基礎生産者の復元や根源岩評価に利用されることを期待する。

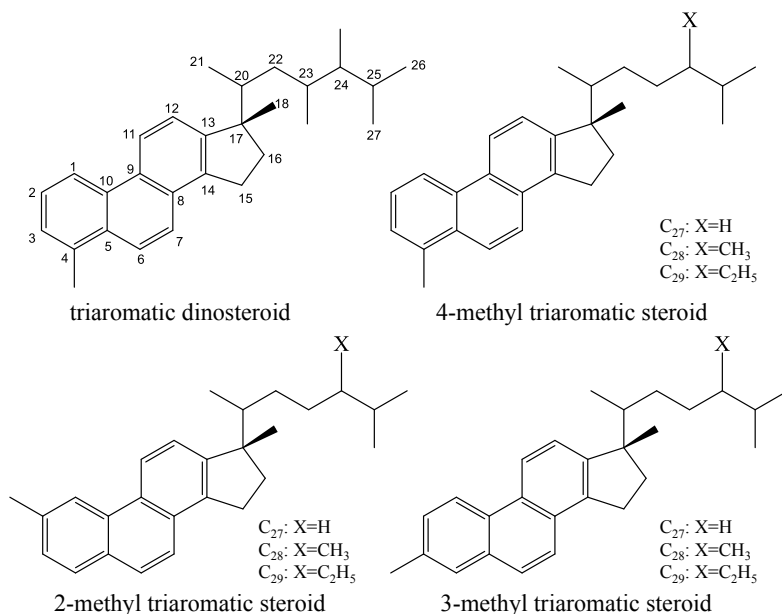
## 謝 辞

本研究に用いた南東フランス・ボコンチアン堆積盆の試料は, 東北大学総合学術博物館の西弘嗣教授と高嶋礼詩准教授からご提供頂いた。また, 大阪市立大学理学研究科の中村英人博士には有益な意見を頂いた。また, 鳥根大学三瓶良和教授および北海道大学低温科学研究所力石嘉人教授には, 本稿の査読をとおして有益なご指摘をいただきました。記して感謝いたします。本研究を進めるにあたり, 安藤に交付された日本学術振興会特別研究員(DC1)研究奨励費(課題番号:13J02814), 沢田に交付された文部科学省科学研究費(課題番号:26287130)の一部を使用した。

## 引用文献

- 安藤卓人・沢田健(2012)堆積岩中におけるA環メチルステロイド(ステランおよび三芳香環ステラン)のGC/MS解析. *Res. Org. Geochem.* **28**, 31-41.
- Ando T., Sawada K., Okano K., Takashima R. and Nishi, H. (2017) Marine primary producer community during the mid-Cretaceous oceanic anoxic events (OAEs) 1a, 1b and 1d in the Vocontian Basin (SE France) evaluated from triaromatic steroids in sediments. *Org. Geochem.* **106**, 13-24.
- Barbanti S. M., Moldowan J. M., Watt D. S. and Kolaczowska E. (2011) New triaromatic steroids distinguish Paleozoic from Mesozoic oil. *Org. Geochem.* **42**, 409-424.
- Brocks J. J., Jarrett A. J. M., Sirantoine E., Kenig F., Moczyłowska M., Porter S. and Hope J. (2016) Early sponges and toxic protists: possible sources of cryostane, an age diagnostic biomarker antedating Sturtian Snowball Earth. *Geobiology* **14**, 129-149.
- Gómez F. (2012) A quantitative review of the lifestyle, habitat and trophic diversity of dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *System. Biodiversity* **10**, 267-275.
- Janouškovec J., Gavelis G. S., Burki F., Dinh D., Bachvaroff T. R., Gornik S. G., Bright K. J., Imanian B., Strom S. L., Delwiche C. F., Waller R. F., Fensome R. A., Leander B. S., Rohwer F. L. and Saldarriaga J. F. (2017). Major transitions in dinoflagellate evolution unveiled by phylotranscriptomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E171-E180.
- Leblond J. D. and Lasiter A. D. (2012) Sterols of the green-pigmented, aberrant plastid dinoflagellate, *Lepidodinium chlorophorum* (Dinophyceae). *Protist* **163**, 38-46.
- Lichtfouse E., Riolo J. and Albrecht, P. (1990) Occurrence of 2-methyl-, 3-methyl- and 6-methyltriaromatic steroid hydrocarbons in geological samples. *Tetrahedron Lett.* **31**, 3937-3940.
- Longo, W.M., Dillon, J.T., Tarozo, R., Salacup, J.M. and Huang, Y. (2013) Unprecedented separation of long chain alkenones from gas chromatography with

- a poly (trifluoropropylmethylsiloxane) stationary phase. *Org. Geochem.* **65**, 94–102.
- Ludwig B., Hussler G., Wehrung P., and Albecht P. (1981) C<sub>26</sub>-C<sub>29</sub> triaromatic steroid derivatives in sediment and petroleum. *Tetrahedron Lett.* **22**, 3313-3316.
- Ma A., Zhang S. and Zhang D. (2008) Ruthenium ion-catalyzed oxidation of asphaltenes of heavy oils in Lunnan and Tahe oilfields in Tarim Basin, NW China. *Org. Geochem.* **39**, 1502-1511.
- Moldowan J. M., Dahl J., Jacobson S. R., Huizinga B. J., Fago F. J., Shetty R., Watt D.S. and Peters K. E. (1996) Chemostratigraphic reconstruction of biofacies: Molecular evidence linking cyst-forming dinoflagellates with pre-Triassic ancestors. *Geology* **24**, 159-162.
- Rampen S. W., Abbas B. A., Schouten S., and Sinnighe Damsté J. S. (2010). A comprehensive study of sterols in marine diatoms (Bacillariophyta): implications for their use as tracers for diatom productivity. *Limnol. Oceanogr.* **55**, 91-105.
- Shetty R., Stoilov I., Watt D. S., Carlson R. M. K., Fago F. J. and Moldowan J. M. (1994) Synthesis of biomarkers in fossil fuels: C-23 and C-24 diastereomers of (20R)-4, 17β, 23, 24-tetramethyl-18, 19-dinorcholesta-1, 3, 5, 7, 9, 11, 13-heptaene. *J. Org. Chem.* **59**, 8203-8208.
- Stoilov I., Shetty R., Pyrek J. S., Smith S. L., Layton W. J., Watt D. S. (1994) Synthesis of a triaromatic steroid biomarker, (20R, 24R)-4, 17α-dimethyl-18, 19-dinorstigmasta-1, 3, 5, 7, 9, 11, 13-heptaene, from stigmasterol. *J. Org. Chem.* **59**, 926-928.
- Volkman J. K., Kearney P., Jeffrey S. W. (1990) A new source of 4-methyl sterols and 5α(H)-stanols in sediments: prymnesiophyte microalgae of the genus *Pavlova*. *Org. Geochem.* **15**, 489-497.
- Volkman J. K., Barrett S. M., Dunstan G. A., Jeffrey S. W. (1993) Geochemical significance of the occurrence of dinosterol and other 4-methyl sterols in marine diatom. *Org. Geochem.* **20**, 7-15.
- Zhang S., Moldowan J.K., Bian L., Zhang B., Zhang L. (2000) Biological and molecular geochemical evidence for dinoflagellate ancestors in the upper Sinian-Cambrian. *Acta Geologica Sinica-English Edition* **74**, 740-747.



Appendix