

# 川金丝猴粪样内 3 种类固醇激素保存时效分析

黄英<sup>①</sup> 胡德夫<sup>①②\*</sup> 刘树强<sup>①</sup> 张志翔<sup>①②</sup>

(<sup>①</sup> 北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083; <sup>②</sup> 国家林业局自然保护区研究中心 北京 100083)

**摘要:** 川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellanae*) 是中国特有的灵长类物种, 生存于海拔 1 400 ~ 3 300 m 的山地森林地带。采用拾取新鲜粪便的非损伤性途径研究该物种野生种群生理状态, 必须首先确定其新鲜粪便在特定保存方法下的保存时效。本研究探讨在川金丝猴自然分布区夏季可获得的低温 ( $4 \pm 1$ ) °C、在 95% 乙醇中保存条件下, 该物种新鲜粪便内 3 种类固醇激素 (睾酮、雌二醇、孕酮) 在 8 个设定天数: 0 (标准对照)、5、6、7、8、10、20、30 d 的保存时效。结果表明, 雌性川金丝猴粪样内睾酮和雌二醇在 30 d 内可稳定保存, 孕酮含量在保存 10 d 时的平均值显著性低于标准参照值 ( $P < 0.05$ ); 雄性川金丝猴粪样中睾酮含量在保存 6 d 时的平均值显著低于标准参照值 ( $P < 0.05$ )。本研究说明, 在野生川金丝猴新鲜粪便保存条件一致的情况下, 该物种新鲜粪样内睾酮、孕酮、雌二醇 3 种激素保存时效并不一致, 实际运用时需要结合研究目的区别对待。

**关键词:** 非损伤性; 粪便; 类固醇; 保存时效

中图分类号: Q958 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2010)06-64-07

## Study on Storing Duration of Fresh Feces of Sichuan Snub-nosed Monkey for Extracting Steroids

HUANG Ying<sup>①</sup> HU De-Fu<sup>①②\*</sup> LIU Shu-Qiang<sup>①</sup> ZHANG Zhi-Xiang<sup>①②</sup>

(<sup>①</sup> College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083;

<sup>②</sup> Center of Nature Reserve, State Forestry Administration, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Snub-nosed Monkey (*Rhinopithecus roxellanae*) is an endemic primates in China, which lives in alpine forests from 1 400 – 3 000 m altitude. Taking their fresh feces as the material of non-invasive method is regarded as a feasible way to study physiologic state of free-ranging population. This work aims to determine the storing duration of feces kept in ethanol for extracting 3 steroids. The fresh fecal samples of snub-nosed monkey were treated with ethanol (95%), then kept at low temperature ( $4 \pm 1$  °C) for 0, 5, 6, 7, 8, 10, 20, and 30 d. The fecal testosterone and estradiol of the female were successfully extracted from fecal samples stored within 30 days; while compared with the control samples (stored 0 d), the content of fecal progesterone of the female and fecal testosterone of the male decreased obviously after having been stored for 10 days and 6 days, respectively. The results showed that, the relative content values of fecal steroid can be used in the comparisons between groups as being preserved in the same condition within 30 days, while the effective storing duration for testosterone, estradiol and progesterone in fresh feces are varied.

**Key words:** Non-invasive; Feces; Steroids; Effective storing duration

基金项目 林业公益性项目 (No. 201004054), 国家林业局自然保护区研究中心项目 (No. 4608101);

\* 通讯作者, E-mail: hudf@bjfu.edu.cn;

第一作者介绍 黄英, 女, 博士; 研究方向: 保护生物学; E-mail: hying-ff@163.com。

收稿日期: 2010-03-17, 修回日期: 2010-07-12

野生动物研究材料的获取是制约其深入研究的瓶颈,集中表现在野外野生动物难以接近,甚至难以发现;其次野生动物的应激水平一般较高,捕捉、保定等方法本身就会导致研究指标异常,不适于自由生活的野生动物生理学研究。近年来,通过采用收集野生动物的粪便、尿液、唾液等排泄物,即非损伤的(non-invasive)取样方法,测定其中类固醇激素的含量,有效拓展了野生动物生理学的研究途径,使深入探知野生动物营养、繁殖、应激、社群、生物节律等生存状态和生存适应问题成为可能<sup>[1-4]</sup>。然而,收集到的新鲜粪便如果不能及时提取处理或低温保存,常温下粪样内及外界的微生物会在短时间内分解其中的各种类固醇激素,导致测定结果的偏差<sup>[5]</sup>。但由于野外条件所限,样品不可能立即进行处理,需要对粪便进行一段时间的保存。目前,因物种及保存方法的不同,粪便内类固醇激素保存时效存在很大差异<sup>[6-7]</sup>,可比性较差。因此,针对目标物种开展粪便类固醇激素保存时效的研究,无疑是安全、可靠地运用该方法的前提条件。

川金丝猴(*Rhinopithecus roxellanae*)仅分布于中国,属国家 I 级重点保护野生物种,迄今关于该物种的研究主要集中于分类、形态、解剖、行为等方面,生理学研究则大多来自圈养条件

下的个体,研究内容多为通过测定尿液中类固醇激素含量的变化,监测川金丝猴的发情、交配、妊娠、分娩等过程<sup>[8-11]</sup>。由于野外获取川金丝猴样本极其困难,对野生川金丝猴的生理学研究极少<sup>[12-15]</sup>。

川金丝猴生存于亚热带山地森林,通过跟踪猴群可发现其夜栖地及采食地,并可获取新鲜粪便材料,为运用非损伤性途径研究野生川金丝猴的繁殖和应激状态提供了便利。同时要求研究者采取适当的粪便保存方法及确定粪便的保存时效。我们认为,乙醇保存川金丝猴新鲜粪便材料适用于中国南部山地潮湿多雨的野外条件,并结合当地气候特征,将 4℃ 定为该动物新鲜粪便保存时效的温度值,设定若干保存时间段,探讨 4℃ 条件下乙醇保存新鲜粪便内睾酮、孕酮、雌二醇 3 种类固醇的时效性,以便为后续的相关野外研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 实验对象为陕西省珍稀野生动物饲养繁育中心(以下简称中心)的笼养川金丝猴,该中心位于陕西省西安市周至县楼观台(E108°19.284',N34°3.988',海拔 511 m)。本实验采样个体计 3 雄 2 雌共 5 只成年川金丝猴,其基本情况见表 1。

表 1 实验用笼养川金丝猴基本状况

Table 1 The background information of Snub-nosed Monkey

姓名 Name	性别 Sex	年龄 Age	产地 Source	入中心时间(年-月) Entrance in the center (Year-Month)	产仔数 Litter
小春 Xiaochun	♀	10	中心自繁 Self-reproduction	1998-05	2
红红 Honghong	♀	8	太白 Taibai	2006-10	0
亮亮 Liangliang	♂	13	太白 Taibai	1996-02	2
美美 Meimei	♂	14	太白 Taibai	1996-04	3
岭岭 Lingling	♂	9	中心自繁 Self-reproduction	1999-04	3

**1.2 样品采集和预保存** 粪便样品采集时间为 2008 年 1 月 6 ~ 16 日,每日 08:00 ~ 18:00 时取其新鲜粪样 3 ~ 4 次,每次取到后立即装入塑料密封袋内,标记带回该中心实验室并置于 -26℃ 冰箱预保存。

**1.3 样品处理** 从冰箱中取出 10 d 收集的全

部粪样,将所采样品按性别分开处理。首先把 2 只雌个体 10 日内采集到的全部粪样充分混匀,以消除采样时间及个体间的差异,分成 48 份,每份 5 g。取其中 6 份样立即冷冻干燥 24 h,抽提各项激素并测定,作为标准参照样;其余 42 份使用 20 ml 95% 乙醇(以下简称乙醇)(1 g

粪样:4 ml 乙醇)于低温( $4 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ (以下简称低温)条件下保存,保存天数设定为5、6、7、8、10、20、30 d 7 个时间段,在每个保存时间段到期时各取出6份样品进行分析测定。使用95%乙醇保存的样品,要先将粪样放置于通风橱内将乙醇充分挥发干净后,再进行冷冻干燥。雄性个体的粪便样品处理方法同雌性。

**1.4 激素提取及测定** 激素提取参照王慧平等<sup>[16]</sup>、Khan 等<sup>[6]</sup>、Terio 等<sup>[7]</sup>的方法,并作改进。采用乙醇加热法进行抽提,即将1 g 干粪样及80%的乙醇10 ml 加入离心管中,70 $^{\circ}\text{C}$ 振荡水浴20 min,冷却至4 $^{\circ}\text{C}$  4 000 r/min 离心15 min,取上清液,再将5 ml 同浓度的乙醇加入离心管,漩涡振荡1 min 4 000 r/min 再次离心15 min,合并两次上清液,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干,加入1.5 ml 甲醇振荡回收,并置于-26 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻待测。

激素测定使用北京科美东雅有限公司的碘<sup>[125I]</sup>类固醇激素放射性免疫分析试剂盒,试剂盒的主要技术参数:(1)测定范围:睾酮(T)为1~200 ng/L;雌二醇( $E_2$ )为10~2 000 pg/ml;孕酮(P4)为0.1~100 ng/ml;皮质醇(Cor)为10~500 ng/ml;(2)灵敏度:T<0.2 ng/L; $E_2$ <5 pg/ml;P4<0.05 ng/ml;Cor<1 ng/ml;(3)平均回收率:T为90%~108%; $E_2$ 为95%~104%;P4为90%~105%;(4)变异系数:T批内<7.4%,批间<9.5%; $E_2$ 批内<8.0%,批间<7.7%;P4批内<7%,批间<10%;Cor批内<5%,批间<10%;(5)特异性:T与雌三醇、雄稀二酮、孕酮、双氢睾酮交叉反应均<0.01%; $E_2$ 与雌三醇、雌酮、孕酮、睾酮交叉反应分别为0.09%、0.7%、0.01%、0.01%;P4与孕烯醇酮、雄稀二酮、雌二醇、交叉反应率分别为0.03%、0.01%、0.01%。以合肥众成机电技术公司生产的DFM-96型多管放射免疫计数器计数。

**1.5 数据统计与分析** 使用Excel软件对数据预处理,SPSS 13.0对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)及Dunnet多重比较,显著性水平设置为 $\alpha = 0.05$ ,测定值统一为干

粪样所含的激素量(ng/g),表示为平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)。

## 2 结果

**2.1 睾酮** RIA法测定结果显示,雌性粪样各个保存时间段的睾酮平均测定值均与标准参照值( $21.02 \pm 1.16$ )ng/g无显著差异;雄性粪样睾酮含量在保存6 d时出现显著性差异 $F_{(1,10)} = 11.23$ , $P < 0.05$ ,睾酮测定值由标准参照的( $47.45 \pm 4.38$ )ng/g下降至( $24.71 \pm 5.18$ )ng/g。显然,第5天到第6天之间存在该激素保存的拐点,之后,保存20 d时睾酮含量又有所上升,达到( $41.07 \pm 5.57$ )ng/g,30 d时含量下降为( $39.09 \pm 1.81$ )ng/g(图1)。

**2.2 孕酮** 雌性川金丝猴粪样内孕酮含量在低温保存10 d时出现了显著性变化 $F_{(1,10)} = 11.92$ , $P < 0.05$ (图2),测定值由标准参照的( $3.84 \pm 0.96$ )ng/g下降至( $0.77 \pm 0.17$ )ng/g。显然,第8天到第10天之间存在该激素保存的拐点,之后20 d时孕酮含量又有所上升,达到( $1.69 \pm 0.22$ )ng/g,30 d时含量上升为( $2.11 \pm 0.2$ )ng/g。

**2.3 雌二醇** 雌性川金丝猴粪样内的雌二醇在低温各个保存时间段的平均测定值均与标准参照值( $5\,548.75 \pm 808.48$ )pg/g无显著差异(图3),雌二醇从第5天的( $4\,142.23 \pm 314.47$ )pg/g到第30天的( $6\,515.11 \pm 578.63$ )pg/g,表现出很好的稳定性。

## 3 讨论

**3.1 川金丝猴新鲜粪样在95%乙醇( $4 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 条件的保存时效** 川金丝猴生活在海拔1 400~3 300 m的山地森林地带,是除人类以外分布海拔最高的灵长类之一。川金丝猴分布的最东端——湖北神农架和最西端——甘肃白水江流域,其栖息地年平均气温10~13 $^{\circ}\text{C}$ ,7月平均温度18~24 $^{\circ}\text{C}$ ,冬季漫长而寒冷,夏季短而凉爽。川金丝猴分布区地处偏僻,道路难行,新鲜粪便样品难于短时间运输至实验室,野外新鲜粪便样品的保存是必须解决的问题。目前低温冷冻

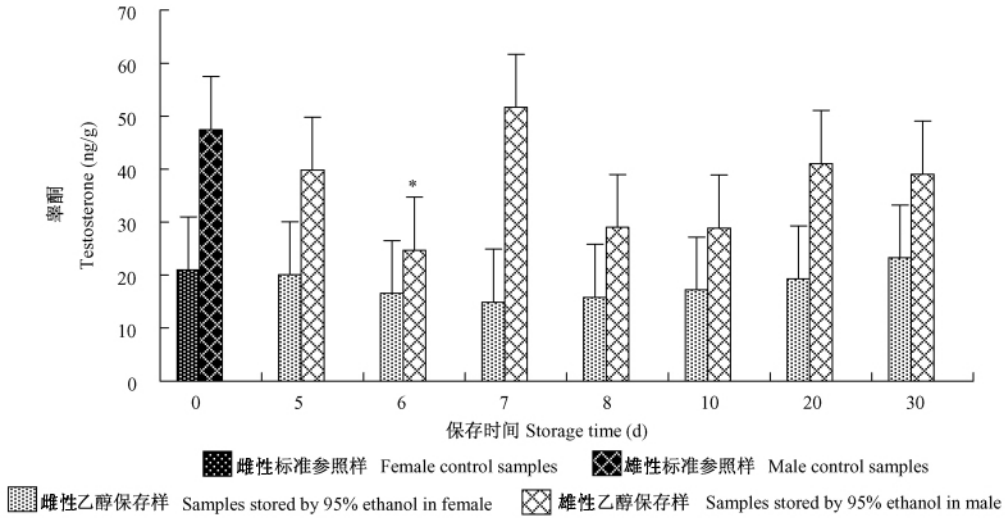


图 1 雌、雄川金丝猴粪样内睾酮含量随保存时间的变化 [95% 乙醇, (4 ± 1) °C ]  
**Fig.1 The content change with storage duration of fecal testosterone stored by ethanol (95%) at 4 ± 1°C in female and male Snub-nosed Monkey**

\* :显著水平 Significance (α = 0.05)

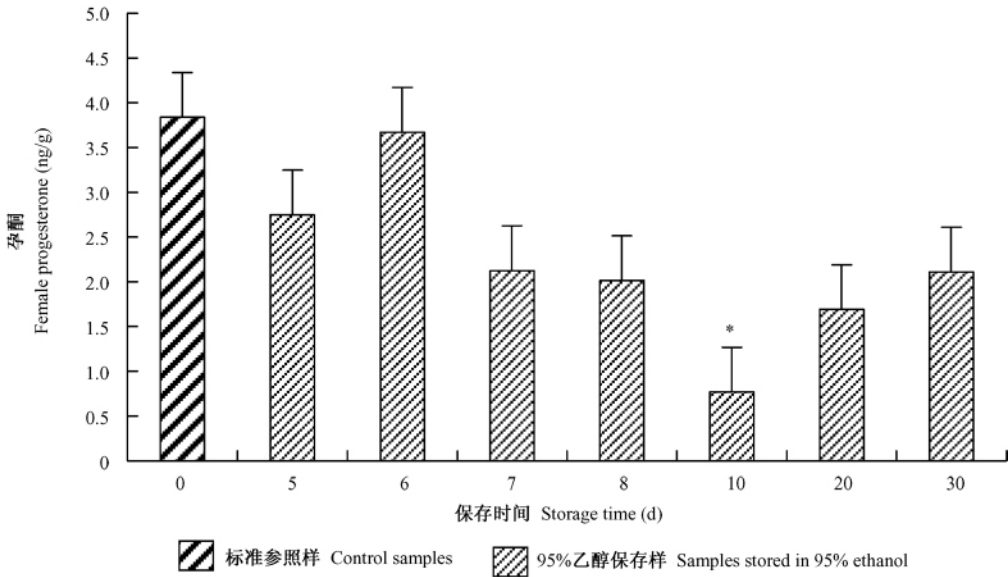


图 2 雌性川金丝猴粪样内孕酮含量随保存时间的变化 [95% 乙醇, (4 ± 1) °C ]  
**Fig.2 The content change with storage duration of female fecal progesterone stored by ethanol (95%) at 4 ± 1°C in female Snub-nosed Monkey**

\* :显著水平 Significance (α = 0.05)

保存是业内公认的最理想的贮藏方式<sup>[17]</sup>,显然,在野外尽可能获得低温条件是延长样品保存时间的可行方法,且温度越低样品越稳定。据我们在湖北神农架和甘肃白水江流域的野外

测定,盛夏 7 月川金丝猴生活的森林内,地表温度约 10°C,而地下 30 cm 处温度仅 4°C 左右,这是我们在野外方便获得并用于保存川金丝猴新鲜粪便的较低温度,更深土层则存在挖掘方面

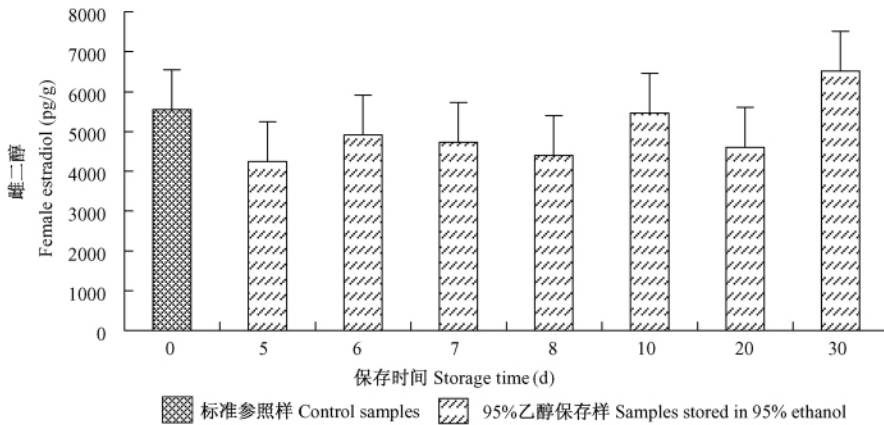


图3 雌性川金丝猴粪样内雌二醇含量随保存时间的变化 [95% 乙醇, (4 ± 1) °C ]  
 Fig. 3 The content change with storage duration of female fecal estradiol stored by ethanol (95%) at 4 ± 1 °C in female Snub-nosed Monkey

的难度。在缺乏冷冻设备的情况下,可以将采到的样品先埋于地下 30 cm 处保存一段时间,便于延长外业工作天数并择时运回实验室。这种保存方法简便易行,适用于川金丝猴的所有自然分布区。因此,川金丝猴新鲜粪便类固醇激素于 4 °C 的保存时效值得特别关注。

本研究将 4 °C 设定为保存时效的温度值,测定乙醇保存川金丝猴新鲜粪便内睾酮、孕酮、雌二醇激素的有效天数,以供野外参考。在野外条件下,利用乙醇是保存新鲜粪便的简便方法<sup>[6,18]</sup>。我们注意到,一些研究者使用 80% 甲醇,90% ~ 95% 乙醇或乙醇与叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>) 的混合物对动物的粪便进行短期常温<sup>[19-20]</sup>或长达 5 个月<sup>[21]</sup>甚至 3.5 年<sup>[22]</sup>的保存,但均未说明粪便内各种激素保存的时效性。Terio 等<sup>[7]</sup>在常温 (22 °C) 下,使用 95% 乙醇保存猎豹 (*Acinonyx jubatus*) 粪样得出,粪样内 4 种类固醇激素 (雄激素、雌激素、孕激素以及皮质激素) 的稳定保存时效可达 14 d。Khan 等<sup>[6]</sup>得出常温下 (25 °C),黄狒狒 (*Papio cynocephalus*) 粪样中糖皮质激素的保存时效不超过 30 d,雌激素的保存时效会更短一些;Lynch 等<sup>[23]</sup>则发现,95% 乙醇和平均温度 20 °C (15 ~ 25 °C) 条件下保存黄狒狒粪样 16 d 后,雄性激素和孕激素的含量会出现显著性上升,而糖皮质激素和雌激素的含量则变动不明显。Galama 等<sup>[18]</sup>采用

80% 甲醇有效保存黑犀牛 (*Diceros bicornis*) 粪样内孕激素达 180 d。由此可见,目前对于不同的物种,采用不同保存方法,类固醇激素保存效果不尽相同,并且对同一物种的不同类固醇激素,各种保存方法的保存时效也不完全一致。对于自由生活的野生动物而言,采用何种保存方法还必须结合实际研究情况加以选择。本研究采用 95% 乙醇和低温 (4 ± 1) °C 保存川金丝猴新鲜粪样 0、5、6、7、8、10、20、30 d,睾酮、孕酮、雌二醇 3 种激素的测定结果显示:在雌性川金丝猴粪样中,各个保存时间段睾酮、雌二醇含量的平均测定值与标准参照值均无显著差异,可以稳定保存至 30 d;孕酮在保存 10 d 时的平均测定值显著性低于标准参照值;在雄性川金丝猴粪样中,睾酮保存 6 d 时的平均测定值显著低于标准参照值。可见,若采用本文的保存方法,各种激素的保存时间不能超过本实验的上限,以保障测定结果的可靠性。

3.2 类固醇激素含量的波动问题 研究灵长类时发现 95% 的乙醇可以杀死粪便中的细菌并能抑制分解酶,能辅助稳定类固醇激素<sup>[6,19,24-25]</sup>。本实验结果表明,3 种类固醇激素的测定值都没有呈现出一般认为的随保存时间的延长而递减的趋势。显然,微生物不是影响粪便内类固醇激素稳定的惟一原因。Khan 等<sup>[7]</sup>总结前人的研究后提出两点推测,第一,

类固醇浓度测定值的波动可能是人为现象,与测定所用的抗体类型有关。群特异性抗体可与母体激素及衍生物的代谢物发生交叉反应,而某些高效性抗体只能和母体激素本身的代谢物反应。利用高效抗体的研究表明,常温下保存的样品,尿中的皮质醇代谢物和粪样中雌激素的代谢物会恶化。相反,利用群特异性抗体的研究发现,常温下保存的粪样,皮质醇和雌激素的代谢物会升高。第二,有机溶剂保存粪样会使粪样内多共轭类固醇代谢物分解或重新结合成单轭或无轭代谢物,成为免疫反应的代谢物。狒狒粪样中皮质醇代谢物 11% 是共轭的<sup>[26]</sup>,而 20% 的雌二醇以雌二醇硫酸盐形式在粪便中排出<sup>[27]</sup>。储存在乙醇溶液中会提高共轭率,其糖皮质激素浓度的增加,证明观察到的化学变化是乙醇引起的,因为共轭键在水性溶剂中更稳定。Hunt 等<sup>[17]</sup>试图通过“胶团假说”解释保存过程中激素的变化,他认为使用乙醇保存时,被乙醇抽提出的呈自由状态的激素在长时间的保存过程中可能会以胶团的形式逐渐重新结合,胶团的结构相对稳定,仅会随着温度等的变化缓慢释放激素,因此造成了激素在保存过程中先上升后下降的一个变动趋势。总之,从现有的对各类动物的实验结果来看,不论哪种解释都有缺陷,造成激素变化的具体原因尚不明确,有待于今后进一步的研究。尽管利用有机溶剂保存粪便样品能够快速抑制乃至杀死微生物,具有显而易见的简便快捷的特点,但各种动物粪样中生化成分不尽相同,生化反应的产物十分复杂,不同的有机溶剂在这些生化反应过程中的作用更是难于查明,因而随着有机溶剂保存时间的延长,粪样内的类固醇激素可能会发生各种变化,最终影响到测定结果的准确性。因此可考虑对某一目标物种有针对性地开展其粪样类固醇激素在不同温度及不同有机溶剂条件下的保存时效测试,依据测试结果确定该物种粪样类固醇激素的保存时效,以避免粪样保存环节上出现偏差。

致谢 本研究工作得到陕西省珍稀野生动物饲养繁育中心川金丝猴馆全体饲养员及北京林业

大学生物学院何东阳同学的支持与协助,谨致感谢。

## 参 考 文 献

- [1] 李明,魏辅文,饶刚,等. 非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用. 动物学报, 2001, 47(3): 338 - 342.
- [2] Schoenecker K A, Lyda R O, Kirkpatrick J. Comparison of three fecal steroid metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). Journal of Wildlife Diseases, 2004, 40(2): 273 - 281.
- [3] Shimizu K. Studies on reproductive endocrinology in non-human primates: application of non-invasive methods. Journal of Reproduction and Development, 2005, 51(1): 1 - 13.
- [4] Dehnhard M, Hildebrandt T B, Knauf T, et al. Comparative endocrine investigations in three bear species based on urinary steroid metabolites and volatiles. Theriogenology, 2006, 66(6/7): 1755 - 1761.
- [5] Yamauchi K, Hamasaki S, Takeuchi Y, et al. Application of enzyme immunoassay to fecal steroid analysis in sika deer (*Cervus nippon*). Journal of Reproduction and Development, 1999, 45(6): 429 - 434.
- [6] Khan M Z, Altmann J, Isani S S, et al. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. General and Comparative Endocrinology, 2002, 128(1): 57 - 64.
- [7] Terio K A, Brown J L, Moreland R, et al. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. Zoo Biology, 2002, 21(3): 215 - 222.
- [8] 阎彩娥,蒋志刚,李春旺,等. 利用尿液中的雌二醇、孕酮含量监测雌性川金丝猴的月经周期和妊娠. 动物学报, 2003, 49(5): 693 - 697.
- [9] 阎彩娥,蒋志刚,李春旺,等. 雌性川金丝猴的邀配行为与尿液雌二醇水平的关系. 动物学报, 2003, 49(6): 736 - 741.
- [10] 高云芳,陈超,李保国,等. 川金丝猴尿液中睾酮水平的季节性变化. 动物学报, 2003, 49(3): 393 - 398.
- [11] 高云芳,高更更,白绪祥,等. 雌性川金丝猴尿液中雌二醇与孕酮水平的季节性变化. 西北大学学报: 自然科学版, 2005, 35(5): 592 - 596.
- [12] Li Y M, Craig B S, Yang Y H. Winter feeding tree choice in Sichuan Snub-Nosed Monkeys (*Rhinopithecus roxellanae*) in Shennongjia Nature Reserve. International Journal of Primatology, 2002, 23(3): 657 - 675.
- [13] 高云芳,王慧平,李保国. 秦岭野生雌性川金丝猴粪便

- 睾酮水平与邀配频次的季节性变化. *动物学报*, 2007, 53(5): 783-790.
- [14] Qi X G, Li B G, Ji W H. Reproductive parameters of wild female *Rhinopithecus roxellana*. *American Journal of Primatology*, 2007, 70(4): 311-319.
- [15] Guo S T, Li B G, Kunio W. Diet and activity budget of *Rhinopithecus roxellana* in the Qinling Mountains. *Primates* 2008, 48(4): 268-276.
- [16] 王慧平, 高云芳, 张新利, 等. 川金丝猴粪尿中类固醇性激素抽提方法比较. *兽类学报*, 2005, 25(3): 297-301.
- [17] Hunt K E, Wasser S K. Effect of long-term preservation methods on fecal glucocorticoid concentrations of gizzly bear and African elephant. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2003, 76(6): 918-928.
- [18] Galama W T, Graham L H, Savage A. Comparison of fecal storage methods for steroid analysis in black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). *Zoo Biology*, 2004, 23(4): 291-300.
- [19] Wasser S K, Bevis K, King G, et al. Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. *Conservation Biology*, 1997, 11(4): 1019-1022.
- [20] Ziegler T, Hodges K, Winkler P, Heistermann M. Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild female Hanuman langurs (*Presbytis entellus*). *American Journal of Primatology*, 2000, 51(2): 119-134.
- [21] Cavigelli S. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Animal Behaviour*, 1999, 57(4): 935-944.
- [22] Curtis D, Zaramody A, Green D I, et al. Non-invasive monitoring of reproductive status in wild mongoose lemurs (*Eulemur mongoz*). *Reproduction Fertility and Development*, 2000, 12(2): 21-29.
- [23] Lynch J W, Khan M Z, Altmann J, et al. Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 132(2): 264-271.
- [24] Strier K B, Ziegler T E. Behavioral and endocrine characteristics of the ovarian cycle in wild muriqui monkeys (*Brachyteles arachnoids*). *Journal of Primatology*, 1997, 42(4): 299-310.
- [25] Monfort S L, Mashburn K L, Brewer B A, et al. Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycan pictus*) by fecal corticosteroid analysis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 1998, 29(2): 129-133.
- [26] Wasser S K, Hunt K E, Brown J L, et al. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of non-domestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology* 2000, 120(3): 260-275.
- [27] Wasser S K, Monfort S L, Southers J, et al. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus*) faeces. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1994, 101: 213-220.