

圈养林麝粪样类固醇激素 提取方法比较及优化

李梦奇^{①#} 吴怡宁^{①#} 陈晓毅^② 王一晨^① 蒋元琳^①
张宝峰^① 石明慧^① 洪绯^{②*} 胡德夫^{①*}

① 北京林业大学生态与自然保护学院, 濒危物种非损伤性研究实验室 北京 100083;

② 漳州片仔癀药业股份有限公司 漳州 363000

摘要: 野生动物粪便作为非损伤性样本具有易于采集、保存及运输的优点, 被广泛用于生理代谢产物提取并探查野生动物的生理状态, 而粪样类固醇激素是最常用的指标。迄今不同研究者对粪样类固醇激素的提取方法并不统一, 而对于各提取步骤的系统比较并进而优化提取方法的研究较少, 可能导致测定结果的不确定性。本研究以圈养林麝 (*Moschus berezovskii*) 粪便为实验样本, 设置粪便取样量、磨碎方式、单次和复提、烘干和免烘干四个步骤的比较, 分别采用酶联免疫法和放射免疫方法检测粪样孕酮值和皮质醇值。结果表明, 0.1 g、0.3 g 和 0.5 g 三组取样量的孕酮值和皮质醇值均不存在显著差异, 但 0.1 g 组的激素测定值稳定性差; 粪便粉碎机磨碎样本和研磨杵研磨样本的孕酮值存在显著差异, 但两者皮质醇值无显著差异; 溶剂提取的单次样本和复提样本的孕酮值和皮质醇值均存在显著差异; 提取液烘干样本与免烘干样本的孕酮和皮质醇不存在显著差异。因此, 圈养林麝粪样类固醇激素提取方法优化为, 采用粉碎机磨碎的粪样且取样量超过 0.1 g 干粪, 提取时进行复提, 在验证待测液中的乙醇浓度不会影响激素测定的前提条件下对上清液免烘干, 可达到准确、快捷及简便的效果。

关键词: 林麝; 粪便; 类固醇激素; 提取方法; 优化

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2024) 06-931-08

Comparison and Optimization of Extraction Method of Fecal Steroid Hormone for Captive Forest Musk Deer *Moschus berezovskii*

LI Meng-Qi^{①#} WU Yi-Ning^{①#} CHEN Xiao-Yi^② WANG Yi-Chen^① JIANG Yuan-Lin^①
ZHANG Bao-Feng^① SHI Ming-Hui^① HONG Fei^{②*} HU De-Fu^{①*}

① Laboratory Animal Noninvasive Studies, School of Ecology and Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083;

② Zhangzhou Pientzehuang Pharmaceutical Co., Ltd, Zhangzhou 363000, China

Abstract: [Objectives] Wildlife feces have the advantage of being easy to collect, preserve and transport as a

基金项目 福建省对外合作项目 (No. 2023J10046), 国家自然科学基金项目 (No. 31872962);

* 通讯作者, E-mail: pzhhf123@126.com, hudf@bjfu.edu.cn;

共同第一作者 李梦奇, 女, 硕士研究生; 研究方向: 保护生物学; E-mail: 1849593016@qq.com;

吴怡宁, 女, 硕士研究生; 研究方向: 保护生物学; E-mail: 408666917@qq.com。

收稿日期: 2023-05-29, 修回日期: 2024-09-25 DOI: 10.13859/j.cjz.202423104

non-invasive sample and are widely used for physiological metabolite extraction and to explore the physiological status of wildlife, with fecal steroid hormones being the most commonly used indicator. There are few researches on the systematic comparison of each extraction step to optimize the extraction method, which may lead to uncertainty in the determination results. This study used captive Forest Musk Deer feces as experimental samples. A comparison of four steps, including fecal sample amount, grinding method, single or repeated extraction, and drying or non-drying, was set up to explore the influence of different factors on extraction contents and stability of results, so as to optimize the extraction method of steroid hormones in Forest Musk Deer feces. **[Methods]** Fecal progesterone and cortisol contents were detected by enzyme-linked immunoassay and radioimmunoassay respectively. Data were analyzed using one-way ANOVA or independent-samples *t* test. **[Results]** The results showed that there were no significant differences in progesterone and cortisol contents between the 0.1 g, 0.3 g and 0.5 g sample groups, but the stability of the hormone measurements was poor in the 0.1 g group (Fig. 1). The contents of progesterone extracted from feces ground by the grinder were significantly different from that ground with liquid nitrogen by a mortar and pestle ($t = 3.793$, $df = 12$, $P < 0.05$), but there were no significant differences in cortisol between the two groups ($t = 0.307$, $df = 12$, $P > 0.05$) (Fig. 2). There were significant differences in both progesterone and cortisol contents between single and repeated solvent extraction ($t = -4.459$, $df = 13$, $P < 0.05$; $t = -16.077$, $df = 7.434$, $P < 0.05$) (Fig. 3), and no significant differences in progesterone and cortisol between the supernatant (30% ethanol) drying and non-drying groups ($t = -1.502$, $df = 13$, $P > 0.05$; $t = 0.600$, $df = 14$, $P > 0.05$) (Fig. 4). **[Conclusion]** Therefore, the method of extracting steroid hormones from Forest Musk Deer feces is optimized to use feces ground by the grinder and more than 0.1 g, the supernatant should be repeated solvent extraction and no drying (under the premise of verifying that the concentration of ethanol in the liquid to be tested does not affect hormone determination), which could achieve accurate, fast and convenient effect.

Key words: Forest Musk Deer; Feces; Steroid hormones; Extraction method; Optimization

类固醇激素主要包括肾上腺皮质和性腺分泌的激素, 其中肾上腺皮质分泌的糖皮质激素对动物的应激性具有指示作用, 性腺分泌的性激素可以调控动物生殖器官的发育和生殖行为的表达。因此通过测定野生动物的类固醇激素可以监测其生理状态、应激水平和健康情况等, 从而促进野生动物的保护工作。由于野生动物一般行动隐蔽, 或地处偏僻, 且警觉性比较高, 其血液、肌肉组织等样品难以获得, 而粪便作为非损伤性样本具有易于采集、保存及运输的优点, 采集过程中避免了对野生动物的刺激, 并且可以做到连续采集, 从而达到长期监测的效果, 目前成为开展野生动物生理学研究的常用样品。粪样类固醇激素已经被广泛用于研究野生动物的应激 (Rangel-Negrín et al. 2009, Cinque et al. 2017, 唐丹等 2019)、繁殖 (李春

等 2005, Stoops et al. 2012, Hao et al. 2019)、代谢 (Dias et al. 2017, Charpentier et al. 2018) 等, 成为野生动物, 尤其是自由生活的野生动物研究及监测的有力手段。

粪样类固醇激素的提取率受到粪便处理过程中多个环节的影响, 譬如粪便新鲜程度 (郎冬梅等 2011)、粪便取样部位 (于小杰等 2010)、粪便采样时间 (傅文源 2018)、粪便保存方法 (马凯等 2014)、粪便激素提取方法 (毕温磊等 2016, Gholib et al. 2018, 李静宇等 2021)。一般而言, 粪样激素的提取方法涉及设置取样量、磨碎方法、提取溶剂、提取次数、烘干、复溶等步骤, 是目前粪样类固醇激素提取方法的主要环节 (Terio et al. 2002, Pettitt et al. 2007, Kalbitzer et al. 2013, Gholib et al. 2018), 然而, 各物种在粪样类固醇激素提取方法上存

在较大差异,这些差别有的源自动物种类差异,有的源自实验室条件,有的源自研究者的经验(Pappano et al. 2010, Stoops et al. 2012)。

我国是世界上唯一成功繁育麝类的国家,随着科技支撑力度的加大,近年来林麝(*Moschus berezovskii*)饲养种群获得了较快增长。林麝具有胆小、机警、高应激性的特征,血液等组织样本难以批量采集,近十余年来,研究者广泛采用粪便样本的类固醇激素探查林麝的生理状态(郎冬梅等 2012, He et al. 2014, Wang et al. 2016)。然而,迄今林麝粪样类固醇激素的提取方法并不统一,直接导致测定结果的可比性较差,不利于建立长期监测数据库。因此,本研究针对粪便取样量、粪便磨碎方式、提取次数以及烘干 4 个研究较少的因素,同时结合林麝繁育基地的基础实验条件设置提取方法,探究提取方法差异对圈养林麝粪样类固醇激素的提取含量及结果稳定性的影响,为提高圈养林麝粪样类固醇激素提取与测定的准确性以及推广粪便非损伤测定技术提供技术支撑,同时希冀对改进濒危物种的非损伤研究方法有所裨益。

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验动物来自河北省怀来县林麝养殖基地,选取 5 只圈养雌性林麝并采集新鲜粪便。实验林麝每日早晨饲喂精饲料(黄豆粉、玉米粉及麦麸等)和多汁饲料(胡萝卜、白萝卜和南瓜等)混合料,下午饲喂新鲜树叶,实验期间健康状况良好。

1.2 样品采集与处理

2022 年 7 月中旬,每日 7:00~9:00 时采集圈养林麝当天排出的新鲜粪便,装入自封袋内并标注好个体标号、采集日期和时间等信息,然后立刻置于 -20℃ 冰柜冷冻保存。实验前将同一个体连续 3 d 的粪便样品充分混匀,选取部分样品使用小型粉碎机粉碎,同时另选部分样品在研钵中加入液氮后使用研磨杵人工

研磨。

1.3 粪样类固醇激素的提取方法

参照粪样类固醇激素提取方法的文献报道及本实验室通行的方法,本研究的粪样类固醇激素的提取步骤为:称取 0.5 g 使用粉碎机磨碎后的干粪放入 10 ml 离心管中,向其中加 5 ml 90%乙醇溶液,震荡 30 min 后以 2 000 r/min 离心 15 min,然后取 1 ml 上清液在 60℃ 烘箱中烘干,待完全烘干后加入 1 ml PBS 溶液震荡 1 min 复溶后制成待测液,置于 -20℃ 冷冻保存待测。每组实验均重复 8 次。

1.3.1 取样量对类固醇激素提取的影响 设置 0.1 g、0.3 g 和 0.5 g 干粪三个取样量的组别,分别加入 1 ml、3 ml 和 5 ml 的 90%乙醇溶液,使用以上方法对粪便样品进行提取。

1.3.2 磨碎方式对类固醇激素提取的影响 称取干粪 0.5 g,分别使用粉碎机磨碎和研钵中加入液氮后使用研磨杵人工研磨,按照以上方法对粪便样品进行提取。

1.3.3 复提对类固醇激素提取的影响 未复提组的提取方法同上;复提组的提取方法为,经第一次提取过程后,再往下层沉淀中加入 5 ml 的 90%乙醇溶液震荡 15 min,以 2 000 r/min 离心 15 min 后取上清液。合并两次上清液,摇匀后从中取出 1 ml 放在 60℃ 烘箱中烘干,待完全烘干后加入 1 ml PBS 溶液,震荡 1 min 复溶制成待测液,放置在 -20℃ 保存直至测定。

1.3.4 烘干对类固醇激素提取的影响 称取 0.5 g 粉碎机磨碎后的干粪,加入 5 ml 90%乙醇溶液,震荡 30 min 后以 2 000 r/min 离心 15 min,然后从中取出两份 0.5 ml 上清液。其中一份加入 1 ml PBS 溶液稀释,震荡 1 min 后置于 -20℃ 冷冻保存待测;另外一份在 60℃ 烘箱中烘干后再加入 0.5 ml 90%乙醇溶液和 1 ml PBS 溶液震荡 1 min 复溶制成待测液,然后置于 -20℃ 冷冻保存待测。

1.4 粪样类固醇激素的测定

采用酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)用 SM-3 全自动

酶免仪(天石天力)测定待测液中的孕酮含量。孕酮酶联免疫检测试剂盒型为 96 T 规格(北京北方生物技术研究所有限公司);使用同位素为碘 125,采用放射性免疫法(radioimmunoassay, RIA)测定待测液中的皮质醇激素含量,测定仪器为 XH6080 放免仪(西安核仪器厂)。

1.5 数据处理

激素含量统一换算为每克干粪的含量。使用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行处理,通过 Shapiro-Wilk test 对数据进行正态分布检验。不同取样量的孕酮含量不符合正态分布,采用非参数检验,不同取样量的皮质醇含量符合正态分布且方差齐性,采用单因素方差分析比较其差异性,多重比较采用 LSD 法;其他组数据采用独立样本 t 检验进行分析,测定结果表示为平均值 $\pm$ 标准差,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 取样量对类固醇激素提取的影响

三种取样量 0.1 g、0.3 g、0.5 g 的孕酮和皮质醇含量分别经 Kruskal-Wallis 检验和单因素方差分析,三组之间无显著差异(图 1),表明粪便取样量不会显著影响提取率。但三个组的标准差比较得出,0.1 g 组的孕酮和皮质醇的标准差分别为 49.760、2.898,均高于 0.3 g 组的 36.382、2.658 和 0.5 g 组的 36.907、2.700,且

0.1 g 组孕酮和皮质醇的变异系数也均大于 0.3 g 组和 0.5 g 组,即取样量为 0.1 g 组激素的测定值稳定性较差。

2.2 磨碎方式对类固醇激素提取的影响

采用独立样本 t 检验比较粉碎机磨碎和加入液氮后使用研磨杵人工研磨粪便的孕酮和皮质醇含量,前者测定值均高于后者(图 2),其中,孕酮的含量具有显著差异($t = 3.793$, $df = 12$, $P < 0.05$),而皮质醇的含量则无显著性差异($t = 0.307$, $df = 12$, $P > 0.05$)。

2.3 复提对类固醇激素提取的影响

未复提组和复提组的测定结果,孕酮含量分别为 181.106 ng/g 和 269.526 ng/g,皮质醇含量分别为 9.325 ng/g 和 26.698 ng/g,复提组的孕酮($t = -4.459$, $df = 13$, $P < 0.05$)和皮质醇($t = -16.077$, $df = 7.434$, $P < 0.05$)含量均显著高于未复提组(图 3)。8 次重复结果的比较表明,皮质醇复提组的标准差和变异系数分别为 0.940、3.52%,明显低于未复提组的 2.700、28.95%;孕酮复提组的变异系数为 14.65%,亦低于未复提组的 20.38%。

2.4 烘干对类固醇激素提取的影响

经独立样本 t 检验,烘干组与未烘干组的孕酮($t = -1.502$, $df = 13$, $P > 0.05$)和皮质醇($t = 0.600$, $df = 14$, $P > 0.05$)测定值均没有显著差异(图 4),但孕酮和皮质醇未烘干组

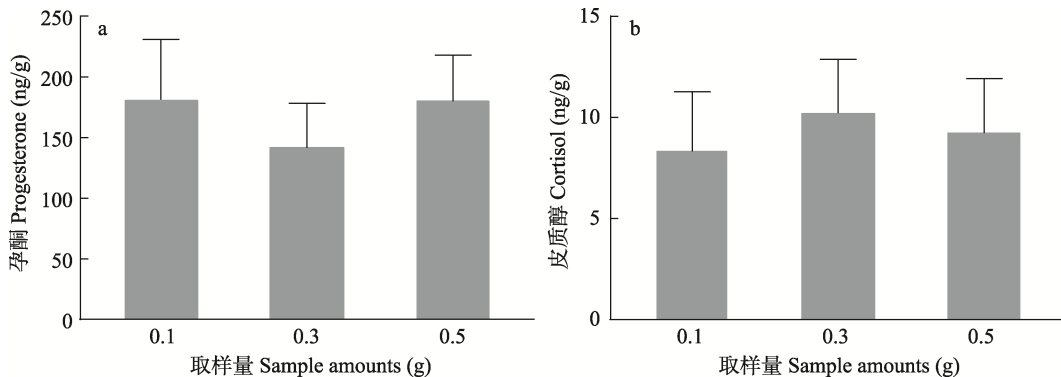


图 1 不同取样量组的激素含量

Fig. 1 Hormone contents in groups with different sample amounts

a. 孕酮; b. 皮质醇。误差线表示标准差。a. Progesterone; b. Cortisol. Error bar shows standard deviation.

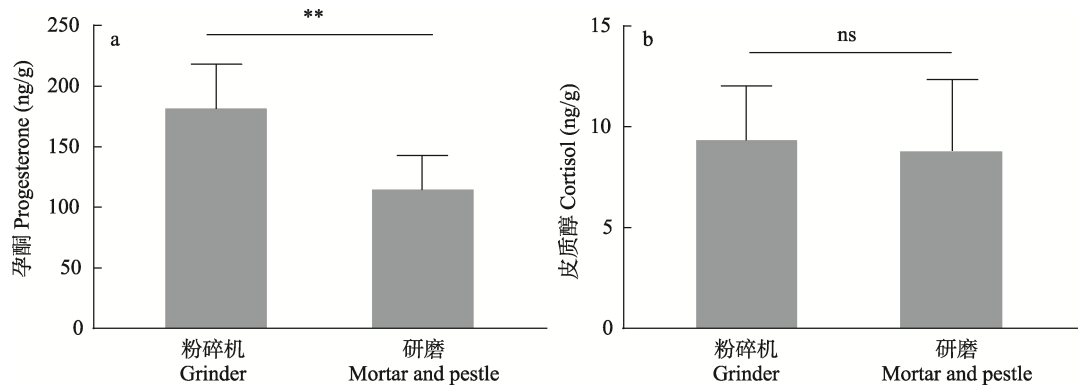


图 2 不同粪便磨碎方式组的激素含量

Fig. 2 Hormone contents in groups with different feces grinding methods

a. 孕酮； b. 皮质醇。误差线表示标准差。a. Progesterone; b. Cortisol. Error bar shows standard deviation. **, $P < 0.01$; ns, $P > 0.05$

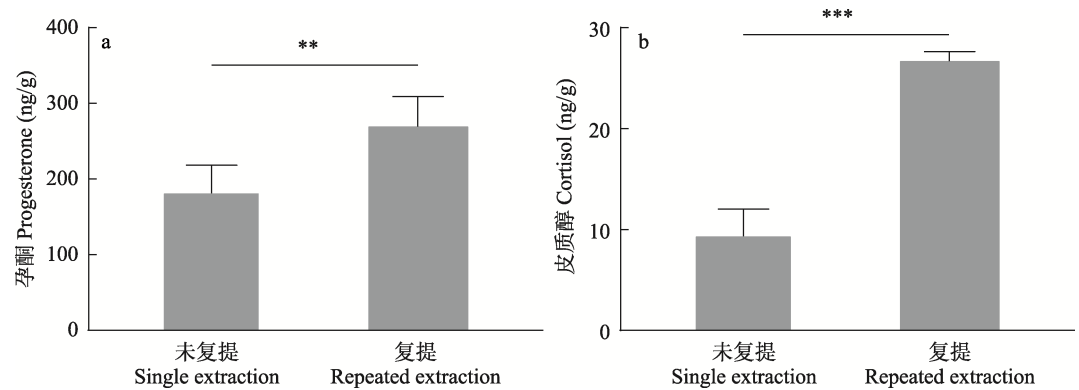


图 3 未复提和复提组的激素含量

Fig. 3 Hormone contents in single and repeated solvent extraction groups

a. 孕酮； b. 皮质醇。误差线表示标准差。a. Progesterone; b. Cortisol. Error bar shows standard deviation. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

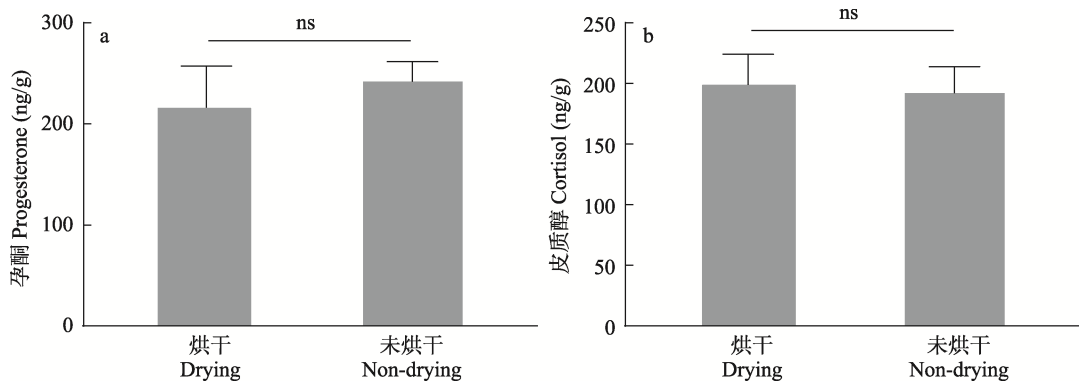


图 4 烘干和未烘干组的激素含量

Fig. 4 Hormone contents in drying and non-drying groups

a. 孕酮； b. 皮质醇。误差线表示标准差。a. Progesterone; b. Cortisol. Error bar shows standard deviation. ns, $P > 0.05$

的标准差和变异系数均低于烘干组,表明未烘干组的测定稳定性更高。

3 讨论

野生动物粪样类固醇激素测定已成为探查其生存状态的有利工具,获得愈来愈广泛的应用(Shutt et al. 2012, Behringer et al. 2017, Kumar et al. 2019)。然而,各研究者采用的提取方法及步骤并不一致,许多研究者对动物粪样激素的提取方法做了一些改进和简化,譬如,对野生黑冠猕猴(*Macaca nigra*, Gholib et al. 2018)、雪豹(*Panthera uncia*, Kinoshita et al. 2021)和非洲野犬(*Lycaon pictus*, Postiglione et al. 2022)等物种粪样激素提取步骤做了较多的简化,将震荡仪器震荡改用手摇震荡、省略复提的步骤、使用过滤代替离心、上清液不烘干直接保存或加入蒸馏水稀释等,以便适于野外工作环境。然而,这些粪样激素提取步骤的简化或省略可能导致的测定结果差异未见系统比较。本研究以圈养林麝的粪样为研究样例,系统比较取样量、粪便磨碎方式、单次或复提以及烘干4个因素对其粪样类固醇激素测定的影响。由于在预实验测定时,使用放射性免疫法测定孕酮的效果较差,因此本研究最终选择酶联免疫法测定孕酮,而皮质醇的测定仍使用放射性免疫法。

本研究结果表明,粪便取样量设置为0.1 g、0.3 g、0.5 g三组的孕酮和皮质醇测定值均无明显差异,但0.1 g组孕酮和皮质醇测定值的标准差和变异系数均高于0.3 g组和0.5 g组,表明取样量影响到类固醇激素测定结果的稳定性。毕温磊等(2016)比较了两种取样量的大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)粪便皮质醇水平,得出0.2 g组显著高于0.5 g组,但后者的稳定性更高,然而,该研究未说明两组取样量与提取溶剂的关系,因而难以判定出现差异的可能原因。本研究结果表明,粪样类固醇激素测定的取样量应大于0.1 g干粪重量,保证激素测定值的稳定性和准确性。同时,粪便处理的粉碎机磨碎与研磨杵研磨(加液氮)的比较表

明,前者的孕酮测定值显著高于后者,但两种处理的皮质醇测定值则无显著差异。其原因可能是粉碎机相较于人工研磨更加细碎和充分,孕酮激素提取效果更好,但对粪样皮质醇则无显著影响。因此,考虑到粪便磨碎方式对孕酮提取效果的影响,实践中应尽可能选择粉碎机磨碎粪便样品的处理方式。

粪样类固醇激素的重复提取旨在提高激素的提取率,更好地反映目标动物的生理状态。本实验的单次提取和复提粪样类固醇激素表明,两组的孕酮和皮质醇测定值存在显著差异,即复提显著提高了两种激素的提取效果,提高幅度分别达到48.82%和186.31%,且增加了测定结果的稳定性。许多研究者省略了复提步骤,必然造成粪样类固醇激素提取效果不佳及测定值偏低。我们认为,虽然单次提取粪样类固醇激素可以获得测定值,但测定值偏低可能造成对动物生理状态的误判,甚至可能得出相反的结论。因此,应尽可能采用复提方法,提高粪样类固醇激素测定值的准确性。

对粪样类固醇激素提取的上清液进行烘干处理旨在去除乙醇溶剂,消除乙醇对后续测定中抗体的影响(张肖等 2012, Wang et al. 2020)。为了避免有机溶剂对激素测定的影响,在使用甲醇、乙醇等溶剂提取粪样中的激素后需要对取出的上清液进行一定处理,常用的方法有放置烘箱烘干、水浴蒸干(唐丹等 2019)、氮气吹扫仪干燥(黎嘉欣等 2018),也有一些研究加蒸馏水或缓冲液稀释。本实验中上清液经60℃烘干和直接加入缓冲液稀释的两种处理方式,结果表明,烘干组与未烘干组的孕酮测定值之间和皮质醇测定值之间均无显著差异。唐婕等(2022)发现,使用离心管烘干上清液的激素测定值显著高于培养皿。这可能是烘干容器表面积造成的激素损耗,而本实验表明,省略烘干步骤可以减少这一损耗。因此,对于圈养林麝粪样而言,烘干与未烘干处理不会影响孕酮和皮质醇的测定值,在验证待测液中的乙醇浓度不会影响激素测定的前提条件下,可省略烘干步骤。

粪样类固醇激素提取的影响因素众多,很多研究对不同抽提方法进行过比较与探讨。Gholib 等(2018)探究了野生黑冠猕猴粪样在常温下的保存时间、常温用 80%甲醇储存时长和干燥粪样时不同烘箱温度对粪样中雌激素代谢产物(estrogen metabolite, E1C)和糖皮质激素代谢产物(glucocorticoid metabolite, GCM)的影响,此外还研究了冷冻干燥、烘箱干燥和新鲜粪样野外直接提取,以及三种粪便处理过程分别使用 80%甲醇、乙醇和商用酒精三种不同溶剂抽提出的激素代谢产物浓度。该研究对粪样的保存和提取类固醇激素代谢产物的方法进行了探讨,在比较抽提方法时考虑到粪便处理过程和提取溶剂两个因素间的相互作用。李静宇等(2021)探究了在湿便法、冷冻干燥粉碎法和冷冻干燥研筛法三种粪便处理方式下 4 种常用抽提方法,即甲醇乙醚法、甲醇乙醇法、乙醇丙酮法和乙醇加热法提取的雌二醇和孕酮含量。该研究对 4 种具体抽提方法的效果进行比较从而得出最佳的提取方法,但不同方法之间的提取过程存在较大差异,无法得知哪些因素会对结果造成影响。本研究选择取样量、研磨方式、复提和烘干 4 个因素,通过单独改变一个因素可以探究该环节对粪样类固醇激素提取是否具有影响,从而对提取方法进行改进与优化。不足之处是仅选取了 4 个因素,并未完全比较提取过程中的每一个环节,例如震荡方式和震荡时间等其他因素对粪样类固醇激素提取的影响。

野生动物粪样激素的提取方法可能因物种、工作条件存在较大差异而不同,但获得较高水平的测定值是确定提取方法的最终目标。本研究针对圈养林麝粪便取样量、磨碎方式、提取次数和烘干 4 个因素的提取实验得出,粪便取样量影响测定值的稳定性,磨碎方式和复提显著影响测定值,而上清液烘干与否不会显著影响测定值。因此,对于地处相对偏僻的林麝繁育基地,进行非损伤取样的粪样类固醇激素测定时,应该采用取样量大于 0.1 g 干粪、使

用粉碎机磨碎、复提、上清液免烘干(已验证待测液中的乙醇浓度不会影响测定值的前提下)的提取步骤,可达到准确、快捷及简便的优化提取方法。在参照文献报道和本实验室原来提取方法的基础上,本研究优化后圈养林麝粪样类固醇激素提取的实验方法为:称取 0.5 g 使用粉碎机磨碎后的干粪放入 10 ml 离心管中,向其中加 5 ml 90%乙醇溶液,震荡 30 min 后以 2 000 r/min 离心 15 min,然后取 1 ml 上清液。再往下层沉淀中加入 5 ml 90%乙醇溶液震荡 15 min,以 2 000 r/min 离心 15 min 后取上清液。合并两次上清液,摇匀后从中取出 1 ml 加入 PBS 缓冲液稀释制成待测液,放置在 -20℃保存直至测定。本实验结果对林麝粪样类固醇激素的提取方法进行了探究与优化,同时也提示,不同物种的粪样类固醇激素提取方法应进行预实验,验证提取方法对测定结果的可能影响,以防出现较大的偏差,因而本研究结果可为相关物种的粪样类固醇检测提供参考。

参 考 文 献

- Behringer V, Deschner T. 2017. Non-invasive monitoring of physiological markers in primates. *Hormones and Behavior*, 91: 3–18.
- Charpentier M J E, Givalois L, Faurie C, et al. 2018. Seasonal glucocorticoid production correlates with a suite of small-magnitude environmental, demographic, and physiological effects in mandrills. *American Journal of Physical Anthropology*, 165(1): 20–33.
- Cinque C, De Marco A, Mairesse J, et al. 2017. Relocation stress induces short-term fecal cortisol increase in Tonkean macaques (*Macaca tonkeana*). *Primates*, 58(2): 315–321.
- Dias P A D, Coyohua-Fuentes A, Canales-Espinosa D, et al. 2017. Hormonal correlates of energetic condition in mantled howler monkeys. *Hormones and Behavior*, 94: 13–20.
- Gholib G, Heistermann M, Agil M, et al. 2018. Comparison of fecal preservation and extraction methods for steroid hormone metabolite analysis in wild crested macaques. *Primates*, 59(3): 281–292.

- Hao Y J, Nabi G, Deng X J, et al. 2019. Non-invasive fecal steroid measurements for monitoring the reproductive status of a critically endangered Yangtze finless porpoises (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*). *Frontiers in Endocrinology*, 10: 606.
- He L, Wang W X, Li L H, et al. 2014. Effects of crowding and sex on fecal cortisol levels of captive forest musk deer. *Biological Research*, 47(1): 48.
- Kalbitzer U, Heistermann M. 2013. Long-term storage effects in steroid metabolite extracts from baboon (*Papio* sp.) faeces—a comparison of three commonly applied storage methods. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(5): 493–500.
- Kinoshita K. 2021. A field-friendly method of measuring faecal glucocorticoid metabolite concentration as a simple stress checker in snow leopards. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(9): 1734–1746.
- Kumar V, Umapathy G. 2019. Non-invasive monitoring of steroid hormones in wildlife for conservation and management of endangered species—A review. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57(5): 8.
- Pappano D J, Roberts E K, Beehner J C. 2010. Testing extraction and storage parameters for a fecal hormone method. *American Journal of Primatology*, 72(11): 934–941.
- Pettitt B A, Wheaton C J, Waterman J M. 2007. Effects of storage treatment on fecal steroid hormone concentrations of a rodent, the Cape ground squirrel (*Xerus inauris*). *General and Comparative Endocrinology*, 150(1): 1–11.
- Postiglione G, Accorsi P A, Ganswindt A, et al. 2022. A field-friendly alternative to freeze-drying faeces for glucocorticoid metabolite analyses of African wild dogs (*Lycaon pictus*). *MethodsX*, 9: 101623.
- Rangel-Negrín A, Alfaro J L, Valdez R A, et al. 2009. Stress in Yucatan spider monkeys: effects of environmental conditions on fecal cortisol levels in wild and captive populations. *Animal Conservation*, 12(5): 496–502.
- Shutt K, Setchell J M, Heistermann M. 2012. Non-invasive monitoring of physiological stress in the Western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*): Validation of a fecal glucocorticoid assay and methods for practical application in the field. *General and Comparative Endocrinology*, 179(2): 167–177.
- Stoops M A, MacKinnon K M, Roth T L. 2012. Longitudinal fecal hormone analysis for monitoring reproductive activity in the female polar bear (*Ursus maritimus*). *Theriogenology*, 78(9): 1977–1986.
- Terio K A, Brown J L, Moreland R, et al. 2002. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. *Zoo Biology*, 21(3): 215–222.
- Wang Y H, Hu X L, Liu G, et al. 2020. Influence of solvents on steroid extraction from animal feces and quantification using enzyme immunoassay. *Wildlife Society Bulletin*, 44(4): 749–755.
- Wang Y H, Liu S Q, Yang S, et al. 2016. Determination of ovarian cyclicity and pregnancy using fecal progesterone in forest musk deer (*Moschus berezovskii*). *Animal Reproduction Science*, 170: 1–9.
- 毕温磊, 杨志松, 陈鹏, 等. 2016. 大熊猫粪便类固醇激素的保存时效性及检测准确性研究. *西华师范大学学报: 自然科学版*, 37(2): 131–136.
- 傅文源. 2018. 虎粪便类固醇激素检测及影响因素的评估. *野生动物学报*, 39(2): 271–276.
- 郎冬梅, 刘文华, 胡德夫, 等. 2011. 圈养林麝粪便类固醇激素保存时效性研究. *四川动物*, 30(3): 357–361.
- 郎冬梅, 刘文华, 王毅花, 等. 2012. 非孕期圈养林麝粪样皮质醇激素变化及其指示作用. *北京林业大学学报*, 34(3): 81–84.
- 黎嘉欣, 杨秋立, 普天春, 等. 2018. 滇金丝猴粪便类固醇激素抽提及检测方法评估. *野生动物学报*, 39(3): 507–512.
- 李春, 魏辅文, 胡锦矗. 2005. 雌性小熊猫粪样中雌二醇与孕酮水平的变化与繁殖启动的关系. *动物学研究*, 26(2): 147–151.
- 李静宇, 张启信, 黄明竟, 等. 2021. 短尾猴粪便雌二醇和孕酮处理与提取方法比较. *动物学杂志*, 56(2): 247–254.
- 马凯, 吴存哲, 尹峰, 等. 2014. 贮存温度和时间对大熊猫粪便样品皮质醇浓度的影响. *兽类学报*, 34(2): 188–192.
- 唐丹, 杨波, 张志忠, 等. 2019. 运输对圈养大熊猫应激影响初探. *野生动物学报*, 40(3): 753–757.
- 唐婕, 杨静, 索丽娟, 等. 2022. 林麝粪便孕酮提取方法的改进. *经济动物学报*, 26(1): 19–22, 28.
- 于小杰, 胡德夫, 唐勇清, 等. 2010. 大熊猫粪团表层和内部类固醇激素含量比较. *经济动物学报*, 14(4): 187–189.
- 张肖, 丁长青. 2012. 粪便类固醇激素检测准确性的影响因素. *动物学杂志*, 47(5): 143–151.