

9-1-1988

การวัดปริมาณ estrone-3-glucuronide และ pregnane-diol-3 α -glucuronide ในปัสสาวะสตรีตั้งครรภ์ปกติ

สมัย สนิษวัฒไชยกุล

สุทัศน์ กลกิจโกวิท

ฉัตรพร ฤชณาจิตต์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal>

 Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

Recommended Citation

สมัย สนิษวัฒไชยกุล, สุทัศน์ กลกิจโกวิท, สุทัศน์; and ฤชณาจิตต์, ฉัตรพร (1988) "การวัดปริมาณ estrone-3-glucuronide และ pregnane-diol-3 α -glucuronide ในปัสสาวะสตรีตั้งครรภ์ปกติ," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 32: Iss. 9, Article 8.

DOI: 10.58837/CHULA.CMJ.32.9.8

Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol32/iss9/8>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การวัดปริมาณ estrone-3-glucuronide และ pregnane- diol-3 α -glucuronide ในปัสสาวะสตรีตั้งครรภ์ปกติ*

สมัย ลิฬพัฒน์ไพบูลย์**

สุทัศน์ กลกิจโกวินท์** ฉัตรพร อุณาจิตต์**

Leepipatpaiboon S, Kolkijkovinda S, Usanachitt C. The measurement of estrone-3-glucuronide and pregnanediol-3 α -glucuronide in normal pregnant urine. Chula Med J 1988 Sep; 32(9): 827-834

The estimation of estrone-3-glucuronide and pregnanediol-3 α -glucuronide output in the morning specimen of urine of pregnant women is feasible with radioimmunoassay. This is by the direct method with a high degree of precision and accuracy. The accuracy level achieved was 86.82% for estrone-3-glucuronide and 88.67% for pregnanediol-3 α -glucuronide. For estrone-3-glucuronide, the within assay variation was 3.00% and the between assay variation was 5.25%. For pregnanediol-3 α -glucuronide, the within assay variation was 7.88% and the between assay variation was 9.15%. The morning specimen of urine was collected from 20 normal pregnant women starting from the 10th week of pregnancy and at weekly intervals until the 38th week of pregnancy.

Result: There was a concomitant rise of the urinary level of both estrone-3-glucuronide and pregnanediol-3 α -glucuronide with increasing gestational age. The above finding suggests that there may be one more parameter available in the assessment of fetal growth and perhaps in the monitoring of deviation from normal fetal growth rate.

Reprint request: Leepipatpaiboon S, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.

Received for publication. January 1, 1988.

* โครงการวิจัยทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วน charcoal ชนิด Norit A เป็นของ Serva Feinbio-chemica., Heidelberg, ประเทศเยอรมัน

4. วิธีการวัดปริมาณ E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g การวัดปริมาณสาร 2 ชนิดนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Samarajeewa และคณะ^(6,12)

4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard, Std) E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g ให้ได้ความเข้มข้น 0,25, 50,100,250,500 และ 1,000 พิโคกรัม/0,1 มล.

4.2 เจือจางปัสสาวะตัวอย่าง (Unknown) สำหรับ E₁-3-g เจือจาง 1:200 และ 1:400 ส่วน Pgdiol-3 α -g เจือจาง 1:2000 และ 1:4000 ด้วย 0.1M phosphate buffer

4.3 วิธีดำเนินการวัด E₁-3-g สรุปเป็นแผนภูมิได้ดังนี้

ปัสสาวะเจือจาง 0.1 มล.

Ab. E₁-3-g⁺ 0.1 มล. (1:10,000)

³H-E₁-3-g⁺ 0.1 มล. (10,000 cpm)

↓ incubate ที่ 37°ซ., 1 ช.ม.

2.5% suspension charcoal 0.2 มล.

↓ แช่ไว้ในน้ำ-น้ำแข็ง 15 นาที

ปั่น 2500 รอบ/นาที ที่ 4°ซ., 10 นาที

เทแยกเอาส่วนที่ใส

เติม Scintillator 5 มล.

นับปริมาณรังสีบีตา

4.4 วิธีการวัด Pgdiol-3 α -g ก็ดำเนินการตามขั้นตอน เช่นเดียวกับ E₁-3-g แตกต่างกันที่ Ab. Pgdiol-3 α -g ใช้ความเข้มข้น 1:15,000

5. การคำนวณหาค่า E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g

คำนวณ percent bound ของสารละลายมาตรฐาน และปัสสาวะตัวอย่างโดยใช้ค่า (Count per minute) ที่ได้จาก β -counter ของสารละลายมาตรฐาน หรือของปัสสาวะตัวอย่างหารด้วย cpm ของหลอดที่ไม่มีสารละลายมาตรฐาน แล้วคูณด้วย $100 \frac{(\text{cpm Std or unknown} \times 100)}{\text{cpm B}_0} = \%B/B_0$

นำค่า percent bound ของสารละลายมาตรฐานไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้กระดาษ logit logarithm graph ให้แกน y เป็นค่า percent bound ของสารละลายมาตรฐาน แกน x เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจะได้กราฟเป็นเส้นตรง (รูป 1,2) ดังนั้นค่าความเข้มข้นของ E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g ในปัสสาวะตัวอย่างจะอ่านได้จากกราฟมาตรฐาน คูณด้วย dilution factor แล้วคำนวณเป็นหน่วยไมโครกรัม/มล.

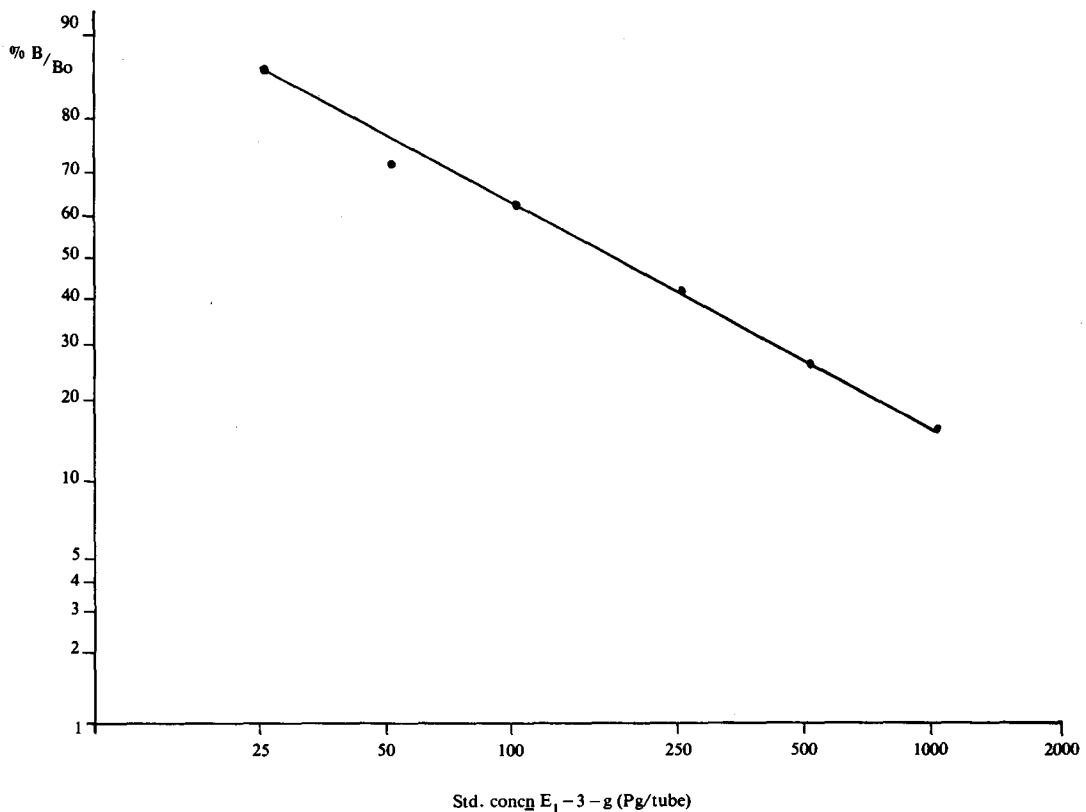


Figure 1 Standard curve of E₁-3-g

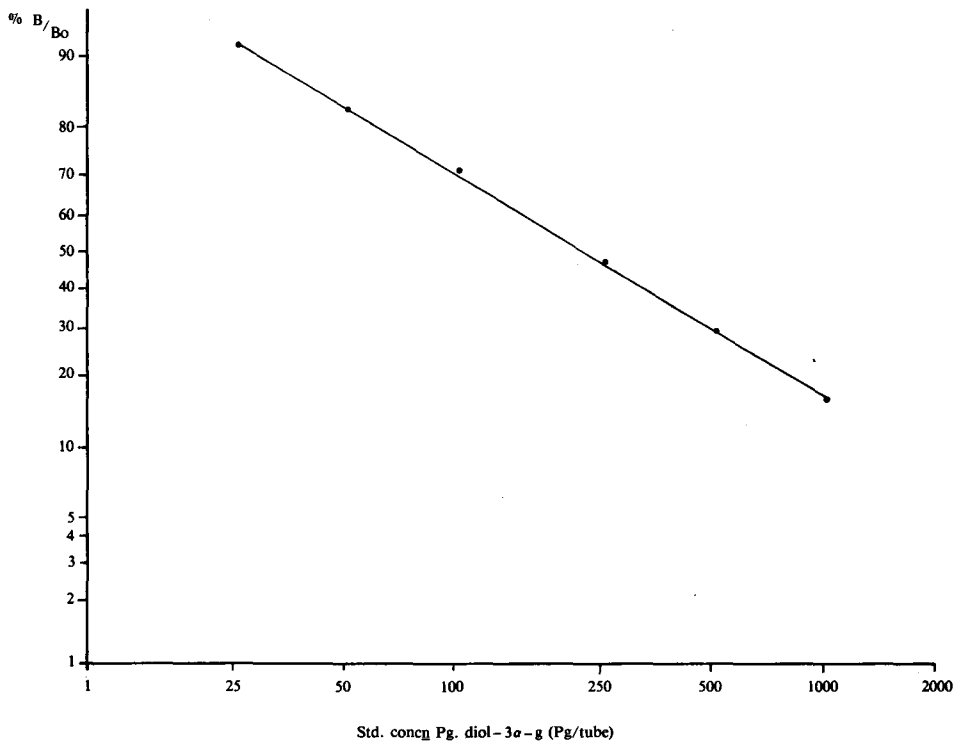


Figure 2 Standard curve of Pg diol - 3α - g.

6. การประเมินผลของการวัด

6.1 ทดสอบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของ Ab-E₁-3-g และ Ab-Pgdiol-3α-g ซึ่งทำโดยวิธี cross reaction วิธีในการดำเนินการคล้ายกับการวัดปริมาณในข้อ 3 แต่มีข้อแตกต่างกันที่ใช้สารที่ต้องการทดสอบปฏิกิริยา

กับ antisera แทนสารละลายมาตรฐาน E₁-3-g หรือ Pgdiol-3α-g และเตรียมสารละลายที่ต้องทดสอบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยา มีความเข้มข้นระหว่าง 250-10,000 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร แล้วเขียนกราฟ ดังรูป 3,4

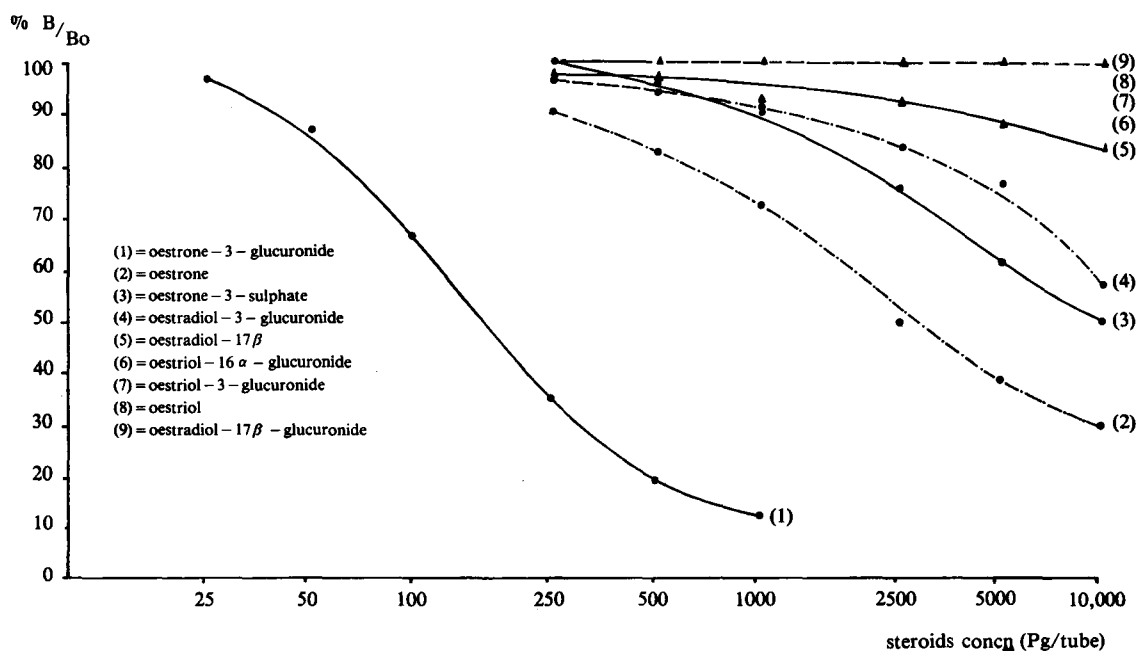


Figure 3 Specificity of E₁ - 3 - g antiserum

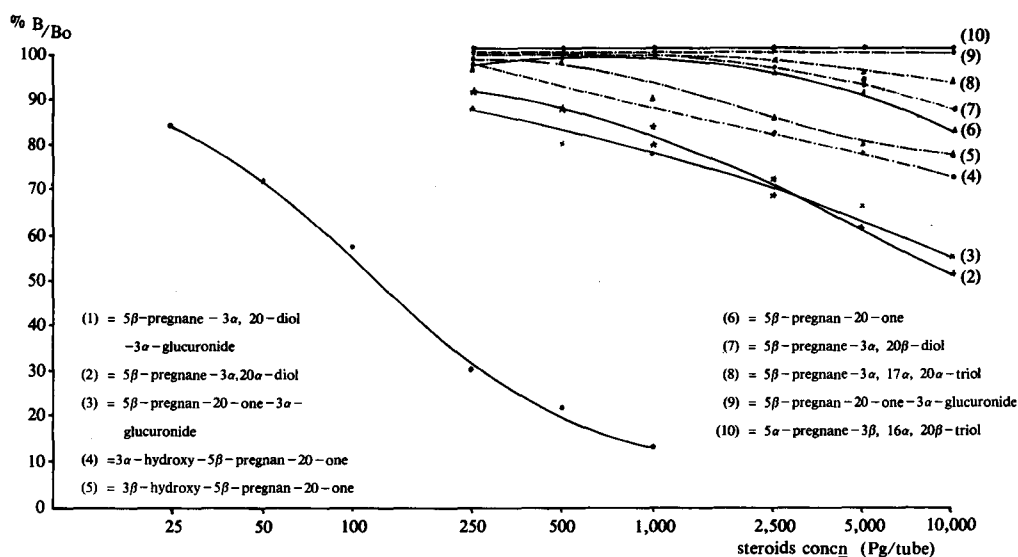


Figure 4 Specificity of Pg. diol - 3 α - g antiserum.

6.2 การทดสอบความแม่นยำในการวัด (precision) และความถูกต้องของการวัด (accuracy)

วิธีทดสอบความแม่นยำในการวัด (precision) ทำโดยการวัดค่าปัสสาวะที่ทราบค่าแล้วแน่นอน (pooled urine) ซึ่งมีความเข้มข้นของ E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g ต่างกัน 3 ระดับคือ ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง แล้วทำการวัด

pooled ละ 10 ตัวอย่างในวันเดียวกัน หาค่าสัมประสิทธิ์ของความเบี่ยงเบน (Coefficient of variation, C.V.) ในแต่ละ pooled เรียกว่า Within assay variation วันรุ่งขึ้นก็ดำเนินการเช่นเดียวกัน แล้วหาค่า C.V. ที่วัดปริมาณระหว่างวัน จะได้ค่า between assay variation (ตารางที่ 1)

Table 1 Precision and Accuracy of the method.

Metabolites	Pooled urine	Precision		Accuracy (%)
		Within assay variation (% C.V.)	Between assay variation (% C.V.)	
E ₁ -3-g	Low	2.50	7.22	87.33
	Medium	3.11	4.45	86.76
	High	3.39	4.11	86.36
Pgdiol-3 α -g	Low	13.54	15.00	92.62
	Medium	5.75	7.69	87.48
	High	4.36	5.83	85.94

ส่วนความแม่นยำในการวัดของ E₁-3-g มีค่า C.V. ของ within assay variation โดยเฉลี่ย 3.00% และ between assay variation เฉลี่ย 5.25% ความแม่นยำในการวัด Pgdiol-3 α -g มีค่า Within assay variation และ between assay variation โดยเฉลี่ย 7.88% และ 9.51% ตามลำดับ

ส่วนการทดสอบความถูกต้องของการวัด (accuracy) ทำโดยการเติมสารมาตรฐานลงในปัสสาวะผู้ขาย ให้ได้ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูงเช่นกัน แล้วทำการวัดกลุ่มละ 10 ตัวอย่าง คำนวณหา percent recovery ของสารมาตรฐานที่รู้ค่าแล้ว แล้วหาค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 1)

ผลการศึกษา

จากการวัดปริมาณ E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g ในปัสสาวะต้นนอนของสตรีตั้งครรภ์ปกติจำนวน 20 ราย พบว่าระดับความเข้มข้นของสารทั้งสองมีแนวโน้มสูงขึ้นตามอายุครรภ์ (รูปที่ 5) ในช่วงปลายของไตรมาสแรก (1st trimester)

ประมาณสัปดาห์ที่ 12 ของการตั้งครรภ์ มีระดับเฉลี่ย (± 1 SD) E_1-3-g และ $Pgdiol-3\alpha-g$ เท่ากับ 0.25 ± 0.23 ไมโครกรัม/มล. และ 10.22 ± 7.89 ไมโครกรัม/มล.ตามลำดับ ในช่วงไตรมาสที่สอง (2nd trimester) ประมาณสัปดาห์ที่ 26 ของการตั้งครรภ์ มีค่าเฉลี่ย (± 1 SD) E_1-3-g

และ $Pgdiol-3\alpha-g$ เท่ากับ 1.38 ± 1.50 ไมโครกรัม/มล. และ 28.85 ± 12.10 ไมโครกรัม/มล.ตามลำดับ ขณะใกล้คลอดสัปดาห์ที่ 38 ของการตั้งครรภ์ มีค่าเฉลี่ย E_1-3-g และ $Pgdiol-3\alpha-g$ เท่ากับ 1.81 ± 1.43 ไมโครกรัม/มล. และ 40.25 ± 16.51 ไมโครกรัม/มล.ตามลำดับ

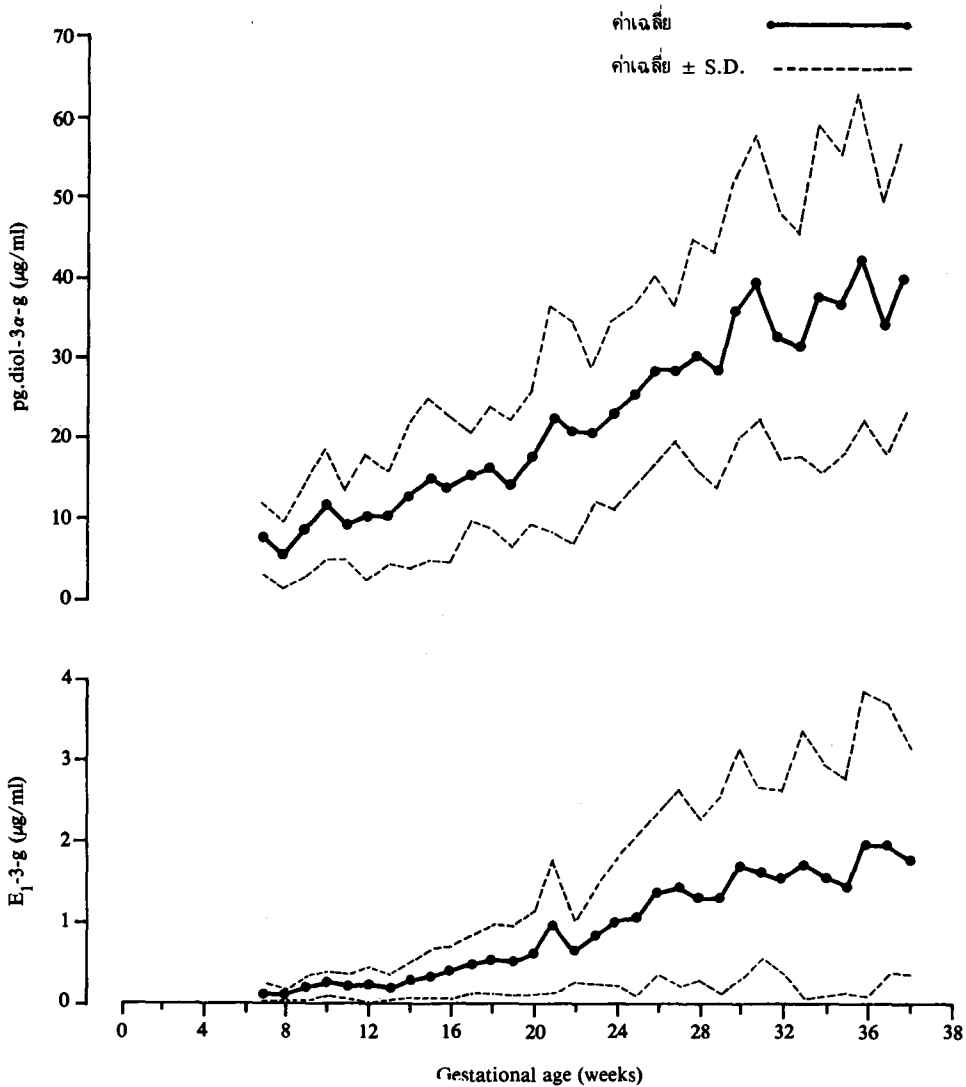


Figure 5 Levels of E_1-3-g & $Pgdiol-3\alpha-g$ in morning urine of 20 normal pregnant women.

รูปที่ 3 และ 4 แสดงถึงความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของ E_1-3-g antiserum ($Ab E_1-3-g$) และ $Pgdiol-3\alpha-g$ ($Ab Pgdiol-3\alpha-g$) จะเห็นว่า antisera ทั้งสองมีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยามาก มี cross reaction กับสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับสารทั้งสองชนิดนี้น้อยมาก ผลของการทดสอบความแม่นยำในการวัด (Precision) และความถูกต้องของการวัด (Accuracy) แสดงไว้

ในตารางที่ 1 ความถูกต้องของการวัด E_1-3-g และ $Pgdiol-3\alpha-g$ มีค่าเฉลี่ย 86.82% และ 88.67% ตามลำดับ

วิจารณ์

จากผลการวัดปริมาณ E_1-3-g และ $Pgdiol-3\alpha-g$ พบว่าระดับความเข้มข้นของสารสองชนิดนี้มีความแปรปรวนระหว่างวัน (day-to-day variability) คณะผู้วิจัยคิดว่าคง

เกิดจากปริมาตรของปัสสาวะในแต่ละวันไม่เท่ากัน จึงลองคำนวณความเข้มข้นของสารสองชนิดนี้ต่อปริมาตรทั้งหมดของปัสสาวะ แต่ก็ไม่สามารถลดความแปรปรวนลงได้ มีนักวิจัยหลายท่านนำค่า creatinine ในแต่ละตัวอย่างมาหารค่าความเข้มข้นของสารสองชนิดนี้ แต่ก็ไม่สามารถจะแก้ปัญหานี้ได้^(9,11,13) แสดงให้เห็นว่า dilution effects ไม่ใช่สาเหตุที่ทำให้ค่าความเข้มข้นของสารสองชนิดนี้แปรปรวนระหว่างวัน สาเหตุของความแปรปรวนอาจจะมาจากสิ่งอื่น เช่น นอนดึก เก็บปัสสาวะไม่ถูกต้อง แต่ข้อผิดพลาดนี้ก็ได้นำมาช่วยผู้ป่วยให้เก็บปัสสาวะให้ถูกต้องแล้ว และนอกจากนี้ระดับ estrone⁽¹⁴⁾ ที่จะสลายไปเป็น E₁-3-g และ progesterone⁽¹⁵⁾ สลายไปเป็น Pgdiol-3 α -g นั้นมี diurnal change ทำให้ระดับความเข้มข้นของสารสองชนิดนี้ในปัสสาวะมีความแปรปรวนในแต่ละวัน ดังนั้นการที่จะนำเอาผลที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับหรือทำนายพยาธิสภาพของเด็กในครรภ์ต้องเพิ่มความระมัดระวังและจะต้องมีจำนวนตัวอย่างทดสอบให้มากเพียงพอที่จะเชื่อถือได้ตามหลักสถิติ แต่ถึงอย่างไรก็ดีการวัดปริมาณสารทั้งสองในปัสสาวะต้นนอนโดยวิธี RIA นี้ จะให้ประโยชน์กับการศึกษาระดับ estrogen และ progesterone ในทางอ้อม เพราะเมื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับระดับของ estrogen และ progesterone ในหญิงตั้งครรภ์ที่ได้มีผู้ศึกษาไว้แล้วพบว่าระดับ E₁-3-g มีความสัมพันธ์กับ estradiol (E₂) ในน้ำเหลืองและ Pgdiol-3 α -g มีความสัมพันธ์กับ Progesterone ในน้ำเหลือง⁽⁸⁾ เช่นกัน ปัจจุบันจึงมีผู้นิยมหาระดับ metabolite ของ hormone ในปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น เพราะเก็บปัสสาวะได้ง่ายกว่าเจาะเลือด ข้อไม่ดีของการเจาะเลือดนอกจากผู้ป่วยจะเจ็บ ผู้ป่วยยังไม่ค่อยยอมให้เจาะ และยังมีข้อเสียอีกอย่างคือ การเจาะเลือดหา E₂ และ progesterone อาจทำให้เกิดภาวะกดดัน (stress) ทำให้ระดับ E₂ และ progesterone แปรปรวนได้⁽¹³⁾ จากเหตุผลนี้สูติแพทย์อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการพยากรณ์พยาธิสภาพของรังไข่ วินิจฉัยหรือดูแลรักษาโรคอันเกิดจากความผิดปกติของฮอร์โมน estrogen และ progesterone และตรวจแก้ไขภาวะการมีบุตรยาก⁽¹⁶⁾ และนอกจากนี้ระดับ E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g ยังใช้เป็นข้อบ่งชี้การยับยั้งการตกไข่ในสตรีที่หย่าคุมกำเนิด⁽¹⁷⁾ ซึ่งแต่เดิมนิยมวัดระดับ estrogen กับ progesterone ในน้ำเหลืองและการวัดระดับ estrogen และ progesterone จะต้องเจาะเลือดเป็นระยะคือสัปดาห์ละ 2 ครั้งเป็นเวลาประมาณ 2-3 เดือน อาสาสมัครบางคนอาจไม่สบายใจและบางครั้งอาจทำให้เกิดภาวะโลหิตจางชั่วคราวได้ เพราะฉะนั้นถ้าวัดปริมาณ

E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g ในปัสสาวะจะไม่มีปัญหาดังกล่าว การวัดปริมาณสารสองชนิดนี้ ในปัสสาวะทำได้สะดวก ได้ผลรวดเร็วเท่ากับวิธีทางเคมีที่ใช้ในปัจจุบัน แต่มีข้อดีกว่าที่ใช้ปัสสาวะต้นนอนตอนเช้า ทำให้สะดวกต่อการเก็บปัสสาวะของคนไข้ และสามารถทำการ assay ได้ประมาณ 30 ตัวอย่างต่อวัน เพราะไม่ต้องผ่านกรรมวิธี hydrolysis ด้วยกรดอย่างวิธีเคมี เพียงแต่ทำให้ปัสสาวะเจือจางด้วย buffer ตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น แต่มีข้อเสียคือวิธีการ RIA ต้องใช้สารติดสลากกัมมันตภาพรังสีของ E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g นอกจากนี้ยังใช้เครื่อง β -counter ด้วย ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง จึงมีเพียงบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น ด้วยสาเหตุนี้อาจเป็นอุปสรรคทำให้การวัดสารสองชนิดนี้ไม่แพร่หลายแต่อย่างไรก็ดีวิธี RIA ที่ใช้นี้เป็นวิธีที่ดีสามารถหาค่าได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพราะ antibody ที่ใช้มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาสูงโดยดูได้จากกราฟรูป 3,4 แสดงให้เห็นว่า E₁-3-g antiserum และ Pgdiol-3 α -g antiserum มี cross reaction กับสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับสารสองชนิดนี้น้อยมาก สรุปได้ว่า antisera ทั้งสองชนิดนี้มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาสูงเพียงพอที่จะใช้วัดปริมาณ E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g ในปัสสาวะเจือจางโดยตรง

สำหรับความแม่นยำในการวัด (Precision) และความถูกต้องในการวัด (Accuracy) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับว่าถูกต้องเชื่อถือได้

การวิจัยนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์คือ นำเอาวิธี RIA มาวัดระดับ E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g ในปัสสาวะต้นนอนของสตรีตั้งครรภ์ปกติ วิธีการวัดสารสองชนิดนี้ อาจมีประโยชน์ต่อสูติแพทย์ ถ้านำมาศึกษาดังนี้

1. ศึกษาระดับความแตกต่างของ E₁-3-g และ Pgdiol-3 α -g ในสตรีที่ตั้งครรภ์ปกติ และตั้งครรภ์ผิดปกติ ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ในการติดตามดูแลรักษาคนไข้ที่ตั้งครรภ์ผิดปกติ

2. ศึกษาระดับ Pgdiol-3 α -g เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่ามีไข่ตกทางอ้อมแทนการวัด progesterone ในน้ำเหลือง เพราะมีหลายรายงานบอกว่าระดับ Pgdiol-3 α -g ในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับระดับ progesterone ในน้ำเหลืองก็จะเป็นประโยชน์กับคนไข้ที่ไม่ต้องเจาะเลือด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ที่ได้อนุมัติเงินอุด

ทุนโครงการวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ที่อนุมัติให้ใช้สถานที่ ผู้ป่วย และบุคลากร ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อ้างอิง

1. สุภัญญา วีระวัฒน์กุ่มพะ. ระดับเอสโตรโอดในปัสสาวะของสตรีมีครรภ์ในกรณีปกติและไม่ปกติและประโยชน์ในทางการแพทย์ วิทยานิพนธ์เพื่อปริญญาโททางชีวเคมีภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2513.
2. Bernstein B, Frishman HB, Levin S, Schewartz S. The value of urinary pregnanediol estimation for monitoring early pregnancy. *Fertil Steril* 1978 Feb; 29(2) : 141-143
3. Johanson EDB. Clinical aspects of corpus luteum function. *Acta Endocrinol* 1975; Suppl 199:63
4. Mishell DR, Jr., Thorneycroft IH, Nagata Y, Murata T, Nagamura RM. Serum gonadotropin and steroid patterns in early human gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1973 Nov 1; 117(5) : 631-642
5. Branch CM, Collins PO, Kilpatrick MJ, Collins WP. The effect of conception on the concentration of urinary oestrone-3-glucuronide LH/hCG and pregnanediol-3 alpha-glucuronide. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980 Feb; 93(2) : 228-233
6. Samarajeewa P, Cooley G, Kellie AE. The radioimmunoassay of pregnanediol-3-alpha-glucuronide. *J Steroid Biochem* 1979 Aug; 11(2) : 1165-1171
7. Baker TS, Jennison KM, Kellie AE. The direct radioimmunoassay of estrogen glucuronide in human female urine. *Biochem J* 1979 Feb 1; 177(2) : 729-738
8. Stanczyk FZ, Miyakawa I, Goebelsman U. Direct radioimmunoassay of urinary estrogen and pregnanediol glucuronide during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1980 Jun 15; 137(4) : 443-450
9. Chatterton RT, Jr., Haan JH, Jenco JM, Cheesman KL. Radioimmunoassay of pregnandiol concentrations in early morning urine specimens for assessment of luteal function in women. *Fertil Steril* 1982 Mar; 37(3) : 361-366
10. Adlercreutz H, Brown J, Collins W, Goebelsman U, Kellie A, Campbell H, Spieler J, Braissand G. The measurement of urinary steroid glucuronides as indices of the fertile period in women. World Health Organization, Task Force on Methods for the Determination of the Fertile Period, special programme of research, development and research training in human reproduction. *J Steroid Biochem* 1982 Dec; 17(6) : 695-702
11. Denari JH, Farinati Z, Cases PRF, Oliva A. Determination of ovarian function using first morning urine steroid assay. *Obstet Gynecol* 1981 Jul; 58(1) : 5-9
12. Samarajeewa P, Kellie AE. The radioimmunoassay of steroid glucuronides. *Biochem J* 1975 Nov; 151(2) : 369-376
13. Collins WP, Collins PO, Kilpatrick MJ, Manning PA, Pike JM, Tyler JPP. The concentrations of urinary oestrone-3-glucuronide, LH and pregnanediol-3 alpha-glucuronide as indices of ovarian function. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1979 Feb; 90(2) : 336-348
14. Patricks J, Challis J, Natale R, Richardson B. Circadian rhythms in maternal plasma cortisol, estrone, estradiol and estriol at 34 to 35 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1979 Nov 15; 135(6) : 791-798
15. Challis JR, Workwych JV, Patrick JE. Diurnal changes in the concentration of progesterone in the plasma of women at 34-35 weeks of gestation. *J Endocrinol* 1981 Jun; 89(3) : 337-341
16. Cheesman KL, Ben-Nun I, Chatterton RT, Cohen MR. Relationship of luteinizing hormone, pregnanediol-3-glucuronide and estriol-16-glucuronide in urine of infertile women with endometriosis. *Fertil Steril* 1982 Nov; 38(5) : 542-548
17. Shaw MS, Back DT, Aird SA, Grimmer SFM, Orme MCLE. Urinary concentrations of steroid glucuronides in women taking oral contraceptives. *Contraception* 1983 Jul; 28(1): 69-75