Archive of SID

Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 29, No.3, Autumn 2019 ORIGINAL ARTICLE

Analytical in-house method validation for determination of permethrin (trans & cis isomers), methyl paraben, propyl paraben and BHT

Nariman Sakhaei[1], Ramin Asgharian[2]
[1]Department of Clinical Pharmacy, Tehran Medical Siences, Islamic Azad University. Tehran, Iran
[2] Assistant Professor of Pharmaceutics, Tehran Medical Siences, Islamic Azad University. Tehran, Iran

Abstract

Background: Permethrin is a drug used to cure pediculosis known as head lice. This drug is available in two forms: 1) permethrin topical cream 5%, 2) permethrin shampoo 1%. The aim of this study was to find a method and define the simultaneous cis and trans isomers for permethrin, methyl paraben, propyl paraben and butylated hydroxytoluene in topical cream 5% using the method high-performance liquid chromatography.
Materials and methods: In order to analyze the measuring method, 5 concentration of samples and concentration of permethrin 5% have been provided, which each were injected to HPLC machine. Three times and the validity index such as selectivity, linearity, accuracy and correctness is analyzed.
Results: According to the results of chromatographs, selectivity, linearity, accuracy and correctness were considered as acceptable areas.
Conclusion: Regarding the point that there is no pharmacopeia method to define the ingredients in permethrin cream simultaneously, it is so important to find an efficient analysis method to identify the peak of all ingredients in one chromatogram, considering the industrial production, time saving and increased efficiency of production units. Meanwhile the method was validated to insure that the results are correct, accurate, assurable and repeatable.
Keywords: *High performance liquid chromatography, Validity, Pediculosis, Permethrin.*

Cited as: Sakhaei N, Asgharian R. Analytical in-house method validation for determination of permethrin (trans & cis isomers) and methylparaben and propylparaben and BHT. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(3): **203-209.**

Correspondence to: Ramin asgharian
Tel: *+98 9122168569*
E-mail: Asgharian.r@iaups.ac.ir
ORCID ID: 0000-0002-6560-9859
Received: 5 Feb 2019; **Accepted:** 3 Mar 2019

www.SID.ir

Archive of SID

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۹، شماره ۳، پاییز ۹۸، صفحات ۲۰۳ تا ۲۰۹

Original Article

معتبرسازی روش آنالیز برای تعیین همزمان ایزومرهای (cis و trans) پرمترین، متیل پارابن، پروپیل پارابن و BHT به روش غیر فارماکوپه ای (داخلی)

نریمان سخائی[۱]، رامین اصغریان[۲]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد نظارت بر امور دارویی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران ، ایران
[۲] استادیار، داروسازی صنعتی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران ، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *: پرمترین دارویی است که برای درمان مبتلایان به بیماری پدیکولوز یا همان شپش مورد استفاده قرار می گیرد. این دارو به ۲ شکل کرم موضعی پرمترین ۵ درصد و شامپو پرمترین ۱ درصد در بازار وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر، تدوین روشی برای شناسایی و تعیین مقدار همزمان ایزومرهای سیس و ترانس پرمترین، متیل پارابن، پروپیل پارابن و دی بوتیل هیدروکسی تولوئن در کرم موضعی پرمترین ۵ درصد با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بود.*

روش بررسی: *برای ارزیابی عملکرد روش‌های اندازه گیری، ۵ غلظت از استاندارد و نمونه کرم پرمترین ۵ درصد تهیه شد و هرکدام ۳ بار به دستگاه HPLC تزریق شد و سپس شاخص‌های معتبر سازی مانند انتخاب پذیری، خطی بودن، صحت و دقت مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *بر اساس نتایج بدست آمده از کروماتوگرام‌ها، انتخاب پذیری، خطی بودن، صحت و دقت این روش در محدوده‌های قابل قبول گزارش شد.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به اینکه روش فارماکوپه‌ای برای برای تعیین همزمان اجزای موجود در کرم پرمترین وجود ندارد، تعیین یک روش آنالیز کارآمد برای شناسایی پیک تمامی اجزاء در کروماتوگرام از دیدگاه تولید صنعتی و صرفه جویی در زمان و درنتیجه افزایش بازده واحدهای تولیدی بسیار حائز اهمیت است. در عین حال، این روش معتبر سازی شد تا اطمینان حاصل شود که نتایج به دست آمده صحیح، دقیق، قابل اطمینان و تکرار پذیر است.*

واژگان کلیدی: *کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، معتبر سازی، پدیکولوز، پرمترین.*

مقدمه

پرمترین با نام آیوپاک ۳فنوکسی بنزیل -۳(۲و۲) دی کلرو ونیل-۲و۲ دی متیل سیکلو پروپان کربوکسیلات مخلوطی از ایزومرهای سیس و ترانس پرمترین است که از نظر شیمیایی این تغییرات به منظور تحمل نور و پایداری حرارتی است (۱). ایزومرهای پرمترین دارای خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوتی هستند، به طوری که سمیت پرمترین با نسبت ایزومرهای سیس به ترانس ۲۵ به ۷۵ کمتر از سمیت آن نسبت به ایزومرهای سیس و ترانس با نسبت ۴۰ به ۶۰ است.

مکانیسم اثر و فارماکوکینتیک پرمترین به این صورت است که از طریق تاثیر روی غشاء سلول‌های عصبی و مختل کردن جریان کانال سدیم، سبب تاخیر در پلاریزاسیون و در نتیجه فلج انگل می‌شود (۲). پرمترین از طریق هیدرولیز استری، به سرعت به متابولیت‌های غیرفعال متابولیزه می‌شود که عمدتاً از طریق ادرار دفع می‌شوند. آلودگی به شپش یک مسئله اجتماعی و گریبان‌گیر بسیاری از جوامع بشری است و از

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران، رامین اصغریان
(**email**: Asgharian.r@iaups.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0002-6560-9859
تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۱۱/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۲/۱۲
www.SID.ir

Archive of SID

جمله معضلات بهداشتی شایع در مدارس است (۳). این بیماری بیشتر در مناطقی که دارای تراکم جمعیت و فقدان بهداشت عمومی است مشاهده می‌شود. با وجود هزینه‌های زیاد در ایران، شیوع آلودگی به شپش در شهرهای ایران هنوز بالاست. نقش شپش به عنوان ناقل تعدادی از بیماری‌ها (تیفوس، تب راجعه، اپیدمیک، تب خندق) از اوایل قرن اخیر شناخته شده است (۴، ۵).

روش‌های اندازه گیری مشخصی در فارماکوپه‌های USP و BP برای تعیین مقدار پرمترین وجود ندارد. تعداد کمی از روش-های اندازه گیری مقدار پرمترین در اشکال دارویی با روش‌های اسپکتروفتومتریک و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا وجود دارد که بسیاری از آنها به دلیل استفاده از موادی که در فاز متحرک می‌تواند برای محیط زیست خطرناک باشد مورد تایید آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا (EPA) نیست (۶). به علاوه، هیچ روشی تاکنون به شناسایی هم‌زمان ایزومرهای پرمترین و پرزرواتیوها و آنتی اکسیدان‌های موجود در کرم پرمترین نپرداخته است. بنابراین این مطالعه با هدف تدوین روشی برای شناسایی و تعیین مقدار هم‌زمان ایزومرهای سیس و ترانس پرمترین، متیل پارابن، پروپیل پارابن و دی بوتیل هیدروکسی تولوئن در کرم موضعی پرمترین ۵ درصد با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد.

مواد و روشها

مواد و معرف‌های شیمیایی همگی از گرید آزمایشگاهی و توسط شرکت داروسازی ایران آوند فر ارائه شد. و در شرکت داروسازی ایران آوند فر مطالعه انجام شد.

دستگاه Hplc Young ling مدل ۹۱۰۰YL با نرم افزار YL-Clarity همراه با ستون کروماتوگرافی مایع (C18،15cm×4.6mm particle size, Length) و دتکتور UV در این آنالیز مورد استفاده قرار گرفت (۷، ۸).

مواد مورد استفاده در این آنالیز، شامل متانول ۹۹/۹ ٪، اسید فسفریک ۹۹/۲ ٪ برای تنظیم pH، آب مخصوص HPLC با هدایت ۰/۰۵ µs/cm، استاندارد پرمترین، استاندارد متیل پارابن و استاندارد پروپیل پارابن بود.

معتبر سازی روش آنالیز(Analytical Method Validation) در کرم پرمترین ۵ درصد

اختصاصی بودن (انتخابی بودن) Selectivity / Specificity

آماده سازی فاز متحرک (**Mobile phase**)

۸۳۵ میلی لیتر متانول را با ۱۶۵ میلی لیتر آب مخلوط کردیم و به وسیله اسید فسفریک غلیظ pH را بر روی ۳ تنظیم کردیم (۹، ۱۰).

آماده سازی استاندارد (Standard preparation)

محلولA : ۳۰ میلی گرم متیل پارابن و ۱۰ میلی گرم پروپیل پارابن را به یک بالن ۵۰ میلی لیتری انتقال داده و با متانول به حجم رساندیم.

محلولB: مقدار مناسبی از استاندارد پرمترین را تا ۴۰درجه سانتی‌گراد گرم کردیم تا هموژن شود و اجازه دادیم به دمای محیط برسد. سپس ۲۰ میلی‌گرم از پرمترین و ۱۰ میلی گرم از BHT را به دقت توزین کرده و به یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری انتقال دادیم و بعد از آن ۱ میلی لیتر از محلول A را به آن اضافه کردیم و توسط متانول به حجم رساندیم.

آماده سازی پلاسبو (Placebo preparation)

در شرایط مشابه، نمونه پایه کرم پرمترین (پلاسبو) آماده شد. برای تعیین انتخابی بودن روش آنالیز باید اثبات شود که پاسخ ایجاد شده از ماده موثره با پاسخ ایجاد شده از سایر اجزای موجود در نمونه مورد آزمایش تداخل ندارد.

خطی بودن (Linearity)

پنج محلول با غلظت مشخص از پرمترین، متیل پارابن، پروپیل پارابن و BHT دراستاندارد پرمترین آماده شد، سپس هر محلول سه بار به دستگاه تزریق شد و آنالیز و کروماتوگرام‌های مربوط به هرکدام ثبت شد.

غلظت محلول‌ها ۸۰ ٪، ۹۰ ٪، ۱۰۰ ٪، ۱۱۰ ٪، ۱۲۰ ٪ بود. میانگین(Mean Area)، انحراف معیار (STDV)، و انحراف معیار نسبی (%RSD) برای هر غلظت محاسبه شد.

آماده سازی استاندارد (Standard preparation)

مقدار ۶۰ میلی گرم از متیل پارابن (MP) و۲۰ میلی‌گرم از پروپیل پارابن (PP) توزین شد و به یک بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری منتقل شد و سپس به وسیله متانول به حجم رسانده شد (Stock solution).

www.SID.ir

Archive of SID

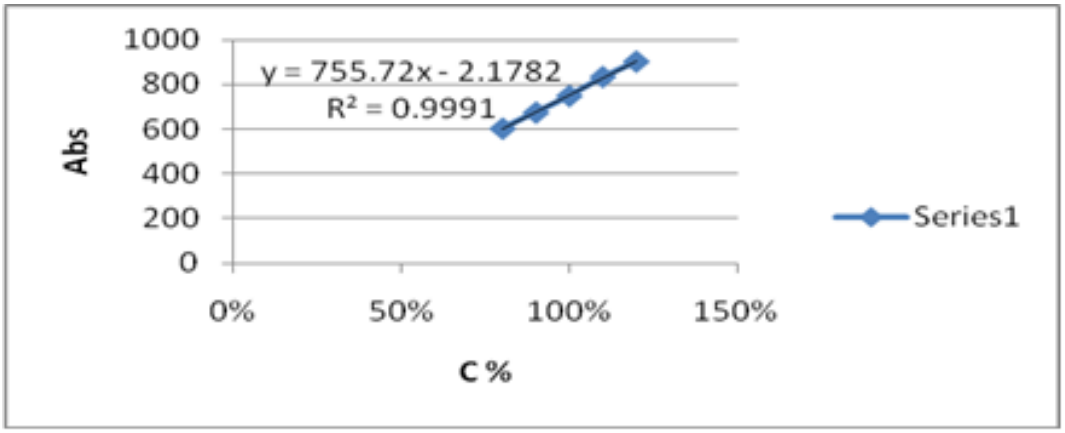
مقدار مناسبی از استاندارد پرمترین را تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد گرم کردیم تا هموژن شود. سپس اجازه دادیم به محدوده دمای محیط برسد. مقدار ۴۰ میلی‌گرم از پرمترین و ۲۰ میلی گرم از BHT را به دقت توزین کردیم و به یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری منتقل کردیم و سپس ۱ میلی لیتر از Stock solution (MP-PP) را به آن اضافه کردیم و به وسیله متانول به حجم رساندیم (از غلظت بالاتر برای تهیه غلظت‌های پایین‌تر استفاده شد). در این آزمون بایداثبات شودکه پاسخ نمونه نسبت به استاندارد یک روند خطی دارد.

صحت (Accuracy)

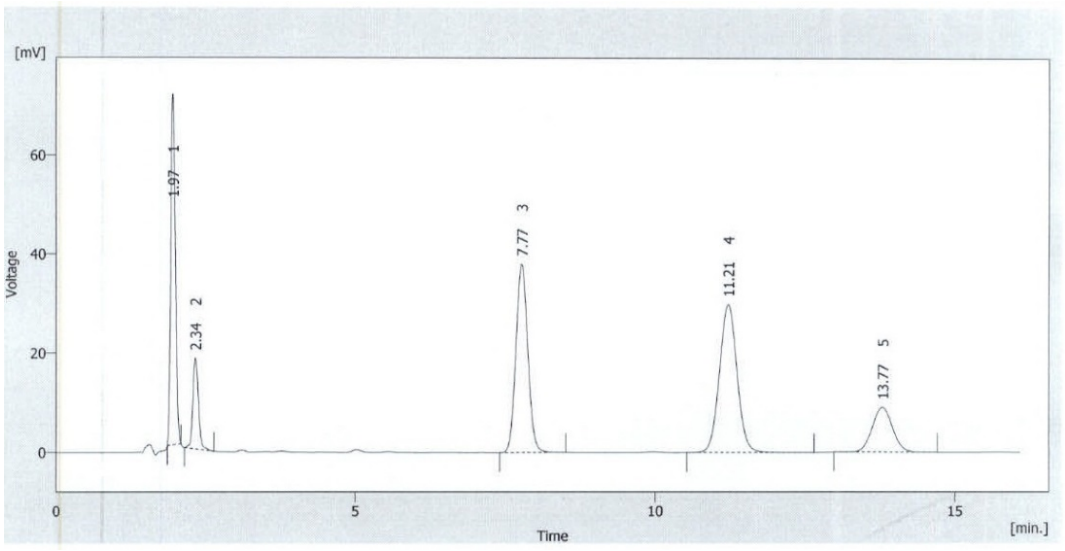
سه غلظت ۸۰ ٪، ۱۰۰ ٪، و ۱۲۰ ٪ از پرمترین، متیل پارابن و پروپیل پارابن را آماده کردیم و هر غلظت را سه بار به دستگاه

جدول۱. مقادیر میانگین سطح زیر پیک، انحراف معیار، و انحراف معیار نسبی (٪) مربوط به ایزومر ترانس پرمترین

	غلظت	سطح زیر پیک (Permethrin-Trans)			میانگین	انحراف معیار	انحراف معیار نسبی (٪)
		۱	۲	۳			
۱	٪۸۰	۶۰۴/۶۹	۶۰۳/۲۲۳	۶۰۵/۵۹۴	۶۰۴/۵۰	۱/۱۹	۰/۱۹
۲	٪۹۰	۶۷۵/۹۸۸	۶۷۶/۹۲۶	۶۷۴/۷۸۱	۶۷۵/۸۹	۱/۰۷	۰/۱۵
۳	٪۱۰۰	۷۵۰/۰۳۸	۷۵۰/۰۹۵	۷۴۹/۲۵۳	۷۴۹/۷۹۰	۰/۴۷	۰/۰۶
۴	٪۱۱۰	۸۳۵/۸۳۴	۸۳۱/۶۰۹	۸۳۵/۸۷۶	۸۳۴/۴۳۰	۲/۴۵	۰/۲۹
۵	٪۱۲۰	۹۰۳/۴۹۲	۹۰۲/۵۹۰	۹۰۳/۱۸۷	۹۰۳/۰۸۹	۰/۴۵	۰/۰۵



نمودار۱. میانگین سطح زیرپیک ایزومر ترانس پرمترین



نمودار۲. کروماتوگرام مربوط تزریق نمونه ۸۰ درصد از کرم پرمترین

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲. Recovery٪ ایزومر ترانس پرمترین مربوط به آزمون صحت

ایزومر ترانس پرمترین (Permethrin Trans)	سطح زیر پیک (Peak Area)				
	۱	۲	۳	میانگین	درصد بازیافت
نمونه ۸۰٪	۶۰۲/۸۰۳	۶۰۱/۴۹۸	۶۰۴/۵۵۰	۶۰۲/۹۵۰	۱۰۰
نمونه ۱۰۰٪	۷۴۲/۱۲۳	۷۳۱/۸۵۹	۷۳۵/۱۱۸	۷۳۶/۳۶۰	۹۸
نمونه ۱۲۰٪	۸۸۹/۱۵۶	۸۸۹/۴۸۳	۸۸۹/۳۱۴	۸۸۹/۳۱۰	۹۸/۳۰

جدول۳. RSD % ایزومر ترانس پرمترین مربوط به آزمون Repeatability*

ارزیابی دقت در یک روز	سطح زیر پیک				
Permethrin-Trans	۱	۲	۳	میانگین	انحراف معیار	انحراف معیار نسبی (٪)
نمونه ۸۰٪	۶۰۲/۸۰۳	۶۰۱/۴۹۸	۶۰۴/۵۵۰	۶۰۲/۹۵۰	۱/۵۳	۰/۲۵
نمونه ۱۰۰٪	۷۴۲/۱۲۳	۷۳۱/۸۵۹	۷۳۵/۱۱۸	۷۳۶/۳۶۶	۵/۲۴	۰/۷۱
نمونه ۱۲۰٪	۸۸۹/۱۵۶	۸۸۹/۴۸۳	۸۸۹/۳۱۴	۸۸۹/۳۱۷	۰/۱۶	۰/۰۱

* محدوده قابل قبول (Acceptance criteria):(3 > RSD %)

جدول۴. Peak Area ایزومر ترانس مربوط به آزمون (Intermediate Precision)

	ارزیابی دقت بین روزها	روز ۱	روز ۲	روز ۳
		سطح زیر پیک ایزومر ترانس پرمترین		
٪۸۰	نمونه ۱	۶۰۲/۸۰۳	۶۰۴/۶۹۰	۶۰۲/۶۷۶
	نمونه ۲	۶۰۱/۴۹۸	۶۰۳/۲۲۳	۵۹۶/۴۵۱
	نمونه ۳	۶۰۴/۵۵۰	۶۰۵/۵۹۴	۶۰۰/۷۷۵
	میانگین	۶۰۲/۹۵۰	۶۰۴/۵۰۰	۵۹۹/۹۶۰
	انحراف معیار	۱/۵۳	۱/۱۹	۳/۱۹۰
	انحراف معیار نسبی (٪)	۰/۲۵	۰/۱۹	۰/۵۳
٪۱۰۰	نمونه ۱	۷۴۲/۱۲۳	۷۴۴/۸۰۴	۷۳۷/۶۷۶
	نمونه ۲	۷۳۱/۸۵۹	۷۴۵/۵۱۳	۷۴۴/۶۴۴
	نمونه ۳	۷۳۵/۱۱۸	۷۴۳/۷۶۰	۷۴۱/۲۲۰
	میانگین	۷۳۶/۳۶۶	۷۴۴/۶۹۲	۷۴۱/۱۸۰
	انحراف معیار	۵/۲۴۰	۰/۸۸	۳/۴۸۰
	انحراف معیار نسبی (٪)	۰/۷۱	۰/۱۱	۰/۴۷
٪۱۲۰	نمونه ۱	۸۸۹/۱۵۶	۸۹۰/۶۶۱	۸۹۵/۷۰۷
	نمونه ۲	۸۸۹/۴۸۳	۸۹۳/۹۹۳	۸۸۸/۴۰۲
	نمونه ۳	۸۸۹/۳۱۴	۸۸۹/۰۵۱	۸۹۱/۴۹۳
	میانگین	۸۸۹/۳۱۷	۸۹۱/۲۳۵	۸۹۱/۸۶۷
	انحراف معیار	۰/۱۶	۲/۵۲۰	۳/۶۶۰
	انحراف معیار نسبی (٪)	۰/۰۱	۰/۲۸	۴

* محدوده قابل قبول (Acceptance criteria):(3 > RSD %)

تزریق کردیم. میانگین (Mean)، Assay%، و درصد بازیابی (Recovery) را برای هر غلظت، با استفاده از معادله خط به دست آمده از آزمون Linearity محاسبه کردیم. در این آزمون باید اثبات شود که نتایج به دست آمده با مقدار واقعی نزدیک هستند. صحت باید به صورت درصد بازیافت گزارش شود.

آماده سازی نمونه

۲۰۰۰ میلی‌گرم از نمونه کرم را به لوله سانتریفوژ ۲۰میلی لیتری منتقل کرده و به آن ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه کردیم. سپس لوله را درحمام آب با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه قرار دادیم. بعد از آن لوله را در حمام آب یخ به مدت ۲۰ دقیقه قرار دادیم. سپس سانتریفوژ کرده و فازها را از هم جدا

www.SID.ir

Archive of SID

کردیم. مایعات شفاف را دکانت و فیلتر کرده و به یک ویال مناسب منتقل کردیم و بعد از آن به وسیله یک پیپت، ۲ میلی‌لیتر از محلول شفاف را به بالن ۵۰ میلی لیتری منتقل کرده و با متانول به حجم رساندیم.

دقت (precision)

تکرار پذیری یا دقت در یک روز (Repeatability)

سه غلظت از ۸۰ تا ۱۲۰ درصد غلظت هدف از پرمترین، متیل پارابن، پروپیل پارابن و BHT آماده شد و هر غلظت ۳ بار به دستگاه تزریق شد. میانگین (Mean)، SD، و RSD ٪ برای همه نمونه‌ها محاسبه شد (۱۱). کلیه آزمون‌های مربوط به این قسمت توسط یک فرد، در یک روز و با یک دستگاه انجام پذیرفت.

ارزیابی دقت بین روزها (Intermediate Precision)

برای ارزیابی این شاخص، یک فرد آزمایش کننده با یک دستگاه در سه روز مختلف این آزمون را انجام داد.

یافته‌ها

با توجه به تعداد زیاد جداول و نمودارها، تنها اثبات خطی بودن ایزومر ترانس پرمترین برای نمونه، در جدول و نمودار ۱ آورده شده است.

در صورتی که مقدار R^2 بزرگ‌تر از ۰/۶۶۷ باشد خطی بودن رابطه غلظت و پاسخ برای نمونه اثبات می‌شود.

در نمودار ۲ کروماتوگرام مربوط تزریق نمونه ۸۰ درصد از کرم پرمترین آمده است.

پیک ۱ مربوط به متیل پارابن- پیک ۲ پروپیل پارابن-پیک ۳ BHT –پیک ۴ ایزومر ترانس پرمترین-پیک ۵ ایزومر سیس پرمترین است.

داده‌های مربوط به ایزومر ترانس پرمترین برای اثبات صحت روش، برای نمونه در جدول ۲ آورده شده است.

میانگین Recovery باید۱۰۰±۳٪ (۱۰۳-۹۷٪)غلظت هدف باشد.

داده‌های مربوط به ایزومر ترانس پرمترین برای اثبات دقت در یک روز (Repeatability) در جدول ۳ آورده شده است.

داده های مربوط به ایزومر ترانس پرمترین برای اثبات دقت در چندروز (Intermediate Precision) در جدول ۴ آورده شده است.

بحث

در مطالعه مشابهی که توسط خانم دکتر افشار و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام شد، چندین فاز متحرک و stability-indicating بودن روش LC برای آنالیز پرمترین مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

مزیت اصلی در این مطالعه استفاده از حلال‌ها و معرف‌هایی بود که برای محیط زیست خطرناک نبودند و از اصل شیمی سبز پیروی می کردند (۱۴). در تمام تکنیک‌ها از اتانول به جای استو نیتریل استفاده شد.

Stability-indicating بودن روش به وسیله محلول‌های مرجع ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و تخریب سریع توسط اسید، باز، گرما، اکسیدان و شرایط فتولیک در تداخل با ایزومرهای پرمترین مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۵). در این مطالعه اعتبار روش شامل Linearity، Selectivity، Accuracy و Robustness مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده از این روش، توانایی شناسایی و جداسازی ایزومرهای سیس و ترانس پرمترین را به طور هم‌زمان نشان داد، ولی جداسازی سایر اکسپیان‌ها با این روش مقدور نبود. بنابراین بر آن شدیم در مطالعه‌ای طراحی شده علاوه بر شناسایی و جداسازی ایزومرهای ترانس و سیس پرمترین، پرزرواتیوها (متیل پارابن و پروپیل پارابن) و آنتی اکسیدان (BHT) موجود در کرم موضعی پرمترین ۵ درصد را هم‌زمان در یک کروماتوگرام شناسایی و جداسازی کنیم و علاوه برآن، این روش آنالیز را معتبر سازی کرده تا نتایج صحیح، دقیق و قابل اطمینان باشد و از نظر اقتصادی و صنعتی مقرون به صرفه گردد.

تشکر و قدردانی

امکانات و منابع مالی این مطالعه توسط شرکت داروسازی ایران آوند فر تامین شد. از تمامی مدیران و کارشناسان این واحد تولیدی که در انجام این مطالعه همکاری کردند، کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

1. Jones KN, English JC 3rd. Review of common therapeutic options in the United States for the treatment of pediculosis capitis. Clin Infect Dis 2003;36:1355-61.

2. Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ, DeVito MJ, Hughes MF. In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. Drug Metab Dispos 2009;37:221-8.

www.SID.ir

Archive of SID

3.Bashir–Bod H, Rahbarian N. The prevalence of head lice infestation and its epidemiological factors in Varamin City primary schools and comparison the effect of ectopar and permethrin pesticides 1998-1999. Proceedings of the first National Congress of Epidemiology; 2000; Yasooj, Iran. [In Persian]

4.Shahraki GH, Azizi K, Yusefi A, Fararuie M. Prevalence of head lice in primary school students in Yasuj (Iran). Armaghan Danesh 2001; 21:22-3. [In Persian]

5.Borghei A,Gharaje S. A comparative study on efficacy of Co-trimoxazole and Permethrin for treatment of pediculosis capitis. J Gorgan Uni Med Sci 2006;8:15-18. [In Persian]

6. EPA hazardous waste listings. A user-friendly reference document, 2008. Available froa: https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-01/documents/hw_listref_sep2012.pdf.

7. García E, García A, Barbas C. Validated HPLC method for quantifying permethrin in pharmaceutical formulations. J Pharm Biomed Anal 2001;24:999-1004.

8. Katz E, Eksteen R, Schoenmakers P, Miller N. Chromatography sciences, In: Katz E, Eksteen R, Schoenmakers P, Miller N, Eds. Handbook of HPLC. New York: Marcel Dekker; 1998.

9 .Dhooghe L, Mesia K, Kohtala E, Tona L, Pieters L,Vlietinck AJ. Development and validation of an HPLCmethod for the determination of alkaloids in the stem bark extract of *Nauclea pobeguinii*. Talanta 2008;76:462-68.

10. Shishovska MA, Trajkovska VP, Stefova MT. A simple HPLC method for determination of permethrin residues in wine. J Environ Sci Health B 2010;45:694-701.

11. Ermer J, Ploss HJ. Validation in pharmaceutical analysis:Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. J Pharm Biomed Anal 2005;37:859-70.

12. Arayne MS, Sultana N, Hussain F. Validated RP-HPLC method for determination of permethrin in bulk and topical preparations using UV–vis detector. J Chromatogr Sc April 2011; 49:287-91.

13.Afshar M, Salkhordeh N, Rajabi M. An ecofriendly and stability- indicating HPLC method for determination of permethrin isomers. Journal of Chemistry 2013: 9.

14. Sheldon RA. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. Chem Soc Rev 2012;41:1437-51.

15. Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD, Kong W, Tsuda Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. Adv Drug Deliv Rev 2007;59:29-37.

www.SID.ir