Chem. Listy *109*, 687−692 (2015) Referát

MIKROSKOPIE S VYHŘÍVANÝM STOLKEM VE FARMACEUTICKÉM PRŮMYSLU

MICHAL ŠIMEK[a,b] a BOHUMIL KRATOCHVÍL[a]

[a] Ústav chemie pevných látek, Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, [b] Zentiva, k.s., U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10
Michal.Simek@vscht.cz, Bohumil.Kratochvil@vscht.cz

Došlo 20.5.15, přijato 10.6.15.

Klíčová slova: hot-stage mikroskopie, mikroskopie s vyhřívaným stolkem, léčivá látka, farmacie

Obsah

1. Úvod
2. Popis hot-stage mikroskopu
3. Příklady použití hot-stage mikroskopu ve farmacii
   3.1. Studium polymorfismu
   3.2. Studium kokrystalů
   3.3. Studium solvátů
   3.4. Identifikace amorfní formy
   3.5. Studium interakcí/kompatibility
   3.6. Studium velikosti a tvaru částic
4. Závěr

1. Úvod

Pevnofázové charakteristiky léčivé látky (API) ovlivňují zpracování, stabilitu a disoluční chování výsledného léku, čímž mají dopad na jeho kvalitu, bezpečnost a účinnost. Léčivé látky jsou proto ve farmaceutickém průmyslu rutinně analyzovány širokou paletou známých technik[1]. V současné době stále modernějšího vývoje a formulace méně stabilních pevných fází léčivých látek je třeba současné techniky doplnit technikami novými.

Mikroskop s vyhřívaným stolkem, neboli „hot-stage mikroskop“ (HSM), je kombinace světelného mikroskopu a termické analýzy, která umožňuje sledovat chování a stav materiálů při řízené změně teploty. Přírůstek HSM do zavedeného portfolia analytických technik byl revoluční a dnes je již považován za jednu ze základních technik charakterizace pevných látek.

První použití hot-stage mikroskopie ve farmaceutickém průmyslu bylo zaznamenáno roku 1971 (Maria Kunhert-Brandstatter)[2]. Díky programovatelnému ohřevu a chlazení bylo možné od té doby rozšířit dosud známé mikroskopické analýzy morfologie o vizualizaci dějů při změně teploty, jakými jsou desolvatace, fázové přechody, tání, rozklad látek a látkové interakce[3].

Současné technologické pokroky ještě více rozšiřují možnosti HSM a stále ji vyvíjejí. Například v kombinaci s moderními způsoby pořízení, uchovávání a prezentací obrazu je možné provádět komplexní charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností látky, pozorovat reakce *in situ*[4] a identifikovat distribuci velikosti částic API ve směsi s excipienty, nebo dezintegrované tabletě[5].

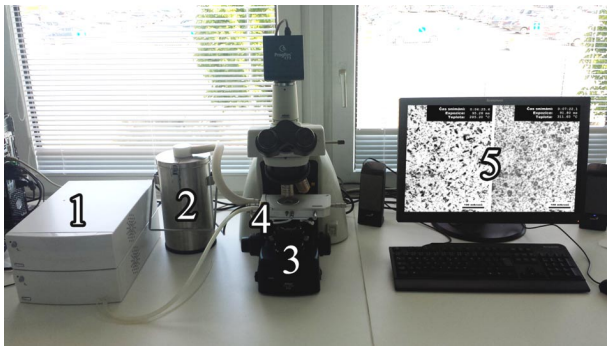
Bod tání, nukleace a růst krystalu, fázové přechody a interakce mezi léčivou látkou a látkami pomocnými jsou příklady použití této techniky. Podrobnější výpis farmaceutické aplikace HSM je následující[3,6]:

- morfologie substance,
- přechody pevná fáze-pevná fáze,
- interakce mezi rozdílnými substancemi,
- rozpouštění jedné substance ve druhé,
- sublimace a/nebo vypařování,
- tavení nebo zkapalnění ohřevem (přechody fáze pevná-kapalná),
- solidifikace chladnutím (přechody fáze kapalná-pevná),
- nukleace a růst krystalu,
- analýza distribuce velikosti částic.

2. Popis hot-stage mikroskopu

HSM se skládá ze dvou samostatných systémů – optického mikroskopu a vyhřívaného stolku. Vyhřívaný stolek je řízen tepelnou a chladící kontrolní jednotkou s vynikajícím systémem výhřevu a chlazení. Komerčně dostupné systémy umožňují měnit teplotu v rozmezí od –200 °C do 600 °C v závislosti na použité sestavě. Jedna z možných sestav hot-stage mikroskopu je ilustrována na obr. 1. Jsou ovšem známy i nekomerční přístroje, jež byly modifikovány, aby dosahovaly více jak 2000 °C ve velice krátkém čase[7]. Nejmodernějším nástrojem a zároveň rozšířením HSM je „transition temperature“ mikroskopie (TTM), která umožňuje lokalizovat teplotní nehomogenity na povrchu pevných látek[8].

Studovaný materiál je umístěn na mikroskopickém sklíčku do vyhřívaného stolku[9]. Způsob přípravy vzorku je charakteristický danému pozorování. Je možné vzorek pozorovat volně na sklíčku, v kapalině i zakrytý krycím sklíčkem. Připojená řídící jednotka monitoruje teplotní program a ukládá teplotní informace pro následnou analýzu. Záznam obrazu probíhá zpravidla barevnou kamerou s vysokým rozlišením, jelikož umožňuje zachytit i mnohačetné přechody pozorovaných substancí v krátkém teplotním rozsahu[10]. V případě detekce unikajícího plynu, např. při desolvataci, je vhodné vzorek smočit kapkou silikonového oleje a zlepšit tak viditelnost unikajících bublinek plynu[11].



Obr. 1. **Optický mikroskop Nikon eclipse Ni vybavený vyhřívaným stolkem LTS420 od firmy Linkam Scientific Instruments.** Tepelná a chladící jednotka (1), zásobník na kapalný dusík (2), světelný mikroskop s kamerou (3) a vyhřívaným stolkem (4) a počítač (5). Uvedená sestava umožňuje modulaci teploty v rozmezí od –197 do 420 °C

3. Příklady použití hot-stage mikroskopu ve farmacii

Jen během posledních let bylo publikováno nespočet prací, v nichž byla použita hot-stage mikroskopie při charakterizaci API, a proto lze tvrdit, že HSM (společně s DSC, TGA a XRD) je základní technika charakterizace léčivých látek[2,12–15]. Následující kapitoly jsou věnovány jednotlivým aplikacím HSM ve farmacii, aby blíže ilustrovaly její význam a přínos při vývoji léčiv[16].

3.1. Studium polymorfismu

Polymorfismus vykazují látky, jejichž molekuly jsou schopné tvořit více jak jednu krystalovou strukturu[17]. Každá změna vnitřního uspořádání molekul v krystalu – polymorfní přechod, je doprovázena změnou fyzikálněchemických vlastností, stability a chování léčivé látky. Takové přechody mohou být snadno vyvolány celou řadou procesů, kdy se API vystavuje různým typům zatížení. Například při mletí, sušení, tabletování, ale i vlivem okolí při nesprávném skladování.

Význam HSM při studii polymorfismu a polymorfních přechodů byl v minulosti demonstrován na metoklopramidu HCl monohydrátu[18], sulfathiazolu[19], beklomethasonu dipropionátu[20], ibuprofenu[21] a dalších. Ve všech případech byly díky obrazové analýze HSM snímků zjištěny a popsány jevy doprovázející polymorfní přechod během teplotního zatížení. V některých případech byly vizualizovány tři kroky fázového přechodu – dehydratace, rekrystalizace a formování nové krystalové formy, jež se podařilo prokázat i pomocí DSC analýzy.

Jako detailnější příklad uvádíme molekulu venlafaxínu hydrochloridu, jež vykazuje mnohačetnou polymorfii. Pomocí DSC analýzy cyklického ohřevu a chlazení bylo zjištěno, že Formy 1 a 2 podléhají fázové přeměně v blízkosti bodu tání. Forma 1 přecházela na Formu 3 a Formu 5, zatímco Forma 2 zcela konvertovala na Formu 5. Pozorováním těchto dějů pomocí HSM bylo zjištěno, že Forma 5 není příliš stabilní a přechází na Formu 1, při inertní atmosféře, nebo na Formu 4, při laboratorních podmínkách[22].

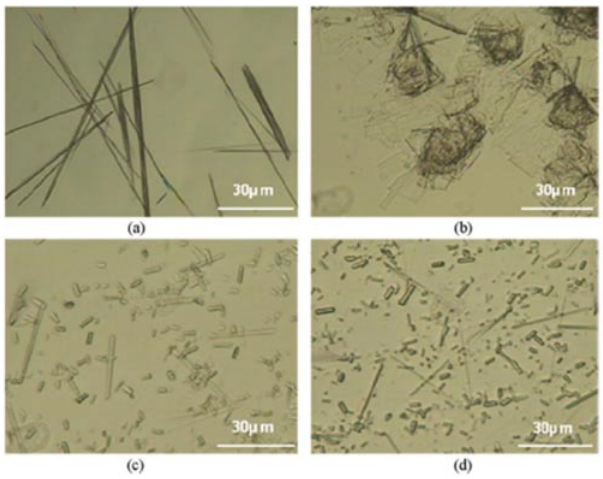
V jiné současné studii polymorfních přechodů byly při –10 °C připraveny krystaly adefoviru dipivoxilu, u nichž bylo docíleno postupných polymorfních přechodů při konstantní teplotě 40 °C, jež vedly k nalezení celkem čtyř rozdílných polymorfních forem této API, které měly odlišný krystalový tvar (obr. 2)[16,23].

Velmi efektivním nástrojem při studii polymorfismu je unikátní spojení HSM, spektrálních zobrazovací technik – především infračervené spektroskopie, a DSC termické analýzy[23]. Tato kombinace technik byla předvedena mimo jiné při charakterizaci gabapentinu[24].

3.2. Studium kokrystalů

Kokrystaly jsou stechiometrické multikomponentní sloučeniny typu hostitel : host (koformer), ve kterých jsou komponenty v převážně neionizovaném stavu. Užší vymezení termínu zahrnuje mezi farmaceutické kokrystaly látky vznikající pouze z komponent, které jsou za běžných podmínek v pevném stavu. Společně jsou poutány slabými vazebnými interakcemi, které ovlivňují pevnofázové vlastnosti vzniklého kokrystalu[25].

Termické metody byly v celé řadě případů použity jako nástroj identifikace fáze kokrystalu a k určení fázových diagramů binárního molekulárního komplexu[26]. HSM ovšem nabízí výhodu při určování těchto binárních systémů v podobě přímé vizualizace probíhajících dějů, která navíc umožňuje nalézt stechiometrický poměr obou látek během jediného experimentu. Lu a Rohani charakterizovali pomocí HSM kokrystal systému theofylin:nikotinamid[27]. Zde bylo pozorováno, že nikotinamid nejprve taje, poté



Obr. 2. **Připravené krystaly adefoviru dipivoxilu při –10 °C (a) a následné formy připravené konstantním vyhříváním při 40 °C po 3 hodinách (b), 8 hodinách (c) a 12 hodinách (d);** převzato z cit.[23]

dochází k nukleaci kokrystalu a expitaxiálnímu růstu při vyšších teplotách až do bodu tání kokrystalu, což bylo možné prokázat i pomocí DSC, TGA a Ramanovy spektroskopie. Obdobné studie byly představeny například na systému lamotrigin:acetamid[28] nebo karbamazepin:nikotinamid[29].

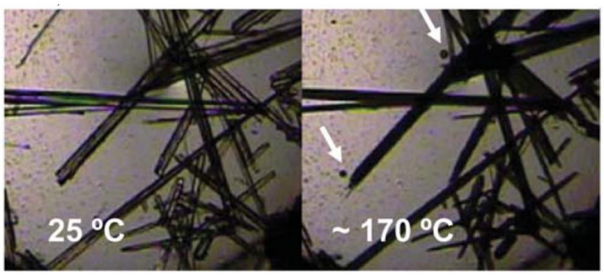
Potenciál HSM v této problematice byl nádherně ilustrován Blagdenem a spol.[30] při screeningu kokrystalů nikotinamidu se sedmi rozdílnými partnery metodou společného tavení. Snímky z HSM prokázaly, že je možné během procesu zřetelně pozorovat vznikající kokrystal na rozhraní dvou fází, ale také pozorovat eutektické směsi a fáze nekokrystalické. Reprodukcí experimentu byl připraven monokrystal příslušného kokrystalu, analyzován pomocí XRSCD a vyřešena jeho krystalová struktura. Při teplotním zatížení připraveného kokrystalu pod HSM nebyla pozorována žádná změna, která by naznačovala polymorfní přechody v jinou formu kokrystalu.

Později byl koncept polymorfního chování pozorován i mezi kokrystalickými fázemi. I v tomto případě bylo prokázáno, že polymorfní přechody mezi kokrystaly ovlivňují významně vlastnosti, jako je např. stabilita nebo rozpustnost, a proto jsou dnes příprava a charakterizace polymorfie kokrystalů důležité při jejich vývoji[16]. V tomto směru uveďme použití HSM při vizualizaci přechodů kokrystalu ethenzamidu s kyselinou ethylmalonovou, Formy I (krystalizace z roztoku) a Formy II (společné mletí), jež napomohla interpretovat ne zcela přesné závěry DSC analýz[31]. Podobné systémy API-koformer byly pomocí HSM charakterizovány u dalších léčivých látek, např. karbamazepinu[32], hydrokortisonu[33], lamotriginu[34]. Dále je HSM často používána k přípravě kokrystalů s hluboce eutektickými rozpouštědly (DES) z taveniny[35,36].

3.3. Studium solvátů

Solváty jsou pevné fáze se zabudovanými molekulami rozpouštědla, většinou vody – takové krystalické fáze se pak označují jako hydráty. Vlivem změny teploty či tlaku dochází k desolvataci, při které se plynné molekuly solventu uvolňují ze struktury pevné fáze. Řízeným ohřevem solvátu v silikonovém oleji pomocí HSM, je možné pozorovat unikající plyn. V příkladu jehličkovitých částic karbamazepinu[37] byly tímto způsobem odhaleny dlouhé kanálky ve struktuře solvátu, kterými při ohřevu unikaly bublinky solventu ze struktury (obr. 3). Při teplotě 190,4 °C poté došlo k roztavení samotného karbamazepinu.

V jiné studii screeningu solvátů R-cinacalcetu hydrochloridu byly nalezeny čtyři solvatované nestabilní formy s kyselinou octovou, chloroformem, 1,4-dioxanem, a tetrachloromethanem[38]. Pomocí HSM byly pozorovány transparentní tenké jehličkovité krystaly, které ztrácely transparentnost po několika hodinách až dnech po jejich vyjmutí z matečného roztoku, zřejmě z důvodu samovolné desolvatace. Stejná změna vzhledu byla pozorována při ohřevu vzorků umístěných v silikonovém oleji, ze kterých unikal plynný solvent. Podobným příkladem je studie solvatomorfie neotamu methanol solvátu[39].



Obr. 3. **Záznam unikajícího plynného solventu ze struktury solvátu karbamazepinu při teplotě přibližně 170 °C;** převzato z cit.[37]

3.4. Identifikace amorfní formy

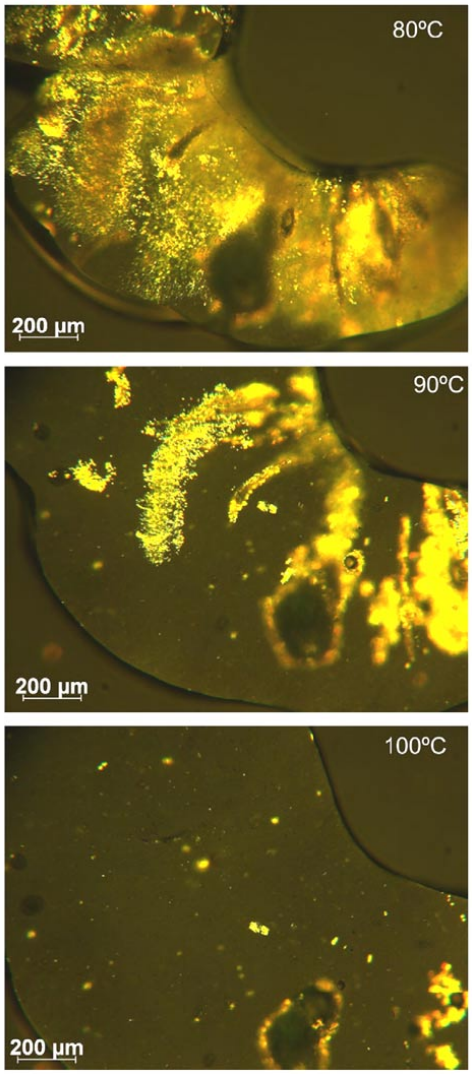
Amorfní fáze vykazují vnitřní uspořádání pouze na krátkou vzdálenost (SRO „short range order“), což znamená, že pravidelné translační opakování molekul je rychle nahrazeno jejich nahodilou distribucí. Amorfní forma vykazuje vyšší rozpustnost a rozpouštěcí rychlost, nicméně, je fyzikálně i chemicky méně stabilní v porovnání s krystalickou formou[25].

Rozlišení amorfní a krystalické formy je velmi rychlé pomocí mikroskopických metod. Díky rozšíření o vyhřívaný stolek je možné sledovat přechody mezi jednotlivými formami, přičemž samovolný přechod je možné pozorovat pouze z fáze amorfní na krystalickou.

Krystalickou formu je možné identifikovat pomocí lomu světla a stáčivosti polarizovaného světla, na rozdíl od amorfní formy, která amorfizací ztrácí molekulární uspořádání krystalu. Díky tomu bylo možné pozorovat interakci krystalů irbesartanu s polarizovaným světlem[40]. Pozorované krystaly postupným ohřevem přecházely na amorfní formu a ztrácely tak schopnost stáčet polarizované světlo. Stejně tak amorfní forma irbesatanu, připravená prudkým ochlazením. Dalším pomalým ohřevem amorfní formy byl pozorován opětovný vznik jehličkovitých krystalů formy krystalické, díky schopnosti stáčet polarizované světlo. Toto pozorování prokázalo indukovanou rekrystalizaci z nestabilní amorfní formy irbesartanu.

Nestabilita amorfní formy je stále aktuálním a ne zcela vyřešeným problémem farmaceutického vývoje léčivých látek. S cílem zvýšit fyzikální stabilitu amorfních forem, probíhá vývoj formulace pevných disperzí, např. společnou extruzí tavenin API a polymeru. Aplikace HSM při analýze tohoto druhu formulací je směřována především na sledování případné krystalické formy API při nedokonalé přípravě amorfní pevné disperze, např. mikrokrystalků (obr. 4). Podobné nedokonalosti byly pozorovány pomocí HSM v případě paracetamolu-PEG 4000 (cit.[41]), hydrokortisonu[33], mannitolu-NaCl (cit.[42]).

Další příklad použití HSM při formulaci pevných disperzí je možné nalézt v práci Lakshmana a spol.[43], který při zakomponování krystalické API do polymeru na bázi PVP postupoval tak, že do roztaveného polymeru nejprve vnesl krystalickou formu API, která se v polymeru rozpus-



Obr. 4. **Polarizovaná HSM pevné disperze acetaminofenu – PEO při 80, 90 a 100 °C.** Roztavením pevné disperze je možné pozorovat přítomné příměsi mikrokrystalků krystalické API; převzato z cit.[49]

tila za zvýšené teploty. Zvýšení teploty ovšem mnohdy vede k látkové degradaci, rozkladu. Lakshman pomocí HSM zjistil, že použitím amorfní formy API, která je charakteristická nízkou teplotou skelného přechodu, je možné výrazně snížit pracovní teplotu extruze, a tím snížit pravděpodobnost degradace formulovaných látek při současném dosažení požadované formulace.

3.5. Studium interakcí/kompatibility

Kompatibilitní studie jsou prováděné za účelem zrychlení vývoje lékové formy díky eliminaci takových excipientů, které způsobují chemickou reakci vedoucí k degradaci API (cit.[44,45]). Tyto studie jsou standardně prováděny na směsi API s excipientem (50:50) pomocí DSC termické analýzy. Pokud DSC profil směsi neodpovídá součtu DSC profilů obou samotných substancí, hovoříme o nekompatibilním systému. Stávají se ovšem situace, kdy takto interpretovaná nekompatibilita znamená pouze nekompatibilitu fyzikální, nikoli chemickou. Typickou situací je rozpuštění jedné látky v tavenině druhé bez chemické reakce[1]. V takovýchto případech je na místě provést HSM analýzu, která podpoří DSC.

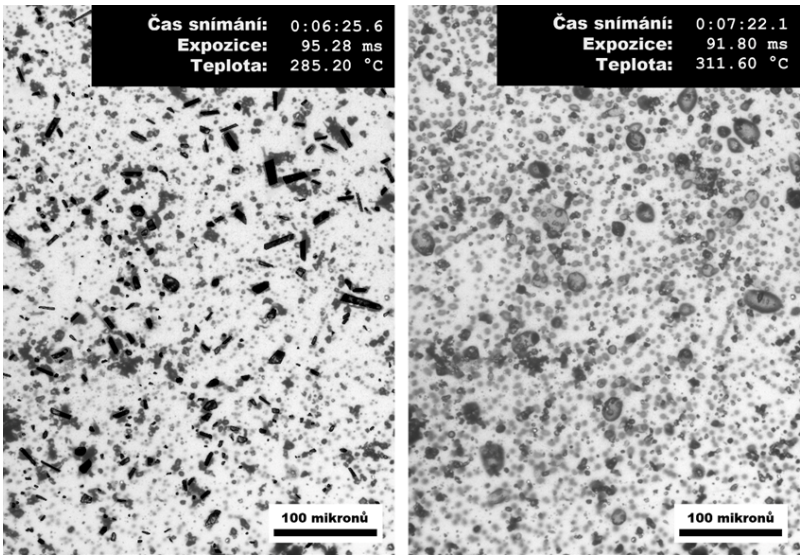
Fyzikální interakce byly pozorovány v systému ibuproxamu s polyvinylpyrrolidinem a polyvinylpyrrolidinem K30. Polyvinylpyrrolidinové mikrokuličky při vyšší teplotě bobtnaly do tvaru velkých porézních aglomerátů, API se nalepila na jejich povrch a vyplnila prázdná místa, zatímco v případě částic K30 pronikla API hluboko do struktury PVP. Pozorovaný děj pokračoval se zvyšující se teplotou, vzhledem k pozitivnímu efektu difuze. Analýzy HSM vyloučily chemické nekompatibility a prokázaly, že změny teplotních profilů souvisí pouze s interakcemi fyzikálními[15].

Dalším příkladem je analýza systému kyseliny acetylsalicylové (ASA) se stearanem hořečnatým. Při individuálním pozorování se stearan hořečnatý roztavil při 150 °C a ASA vykazovala bod tání při 136 °C. Ve směsi 50:50 byly velké částice acetylsalicylové kyseliny obaleny jemnými částicemi stearanu, které tály již při 90 °C a vytvořily kolem částic ASA kapalnou vrstvu. Snížení teploty tání směsi ASA se stearanem hořečnatým indikovala existenci interakcí v tomto systému[46].

3.6. Studium velikosti a tvaru částic

Velikost a tvar částic jsou parametry, které ovlivňují výrobu a chování pevné lékové formy, a to především rozpouštěcí rychlost. Metod měření distribuce velikosti částic (DVČ) čistých látek je známa celá řada[47]. Jejich použití je ovšem velmi omezené na směsi více látek v pevném stavu, pokud je třeba zjistit DVČ jedné z nich.

HSM umožňuje rozlišit jednotlivé soubory částic ve směsi na základě jejich rozdílných bodů tání[5]. V případě analýz API v již formulovaných tabletách je nutné nejprve provést jejich šetrnou dezintegraci a analyzovat až připravený práškový dezintegrační produkt[5] (obr. 5). V našich předchozích pracích byla tato metoda úspěšně použita při studium fragmentace jehličkovitých částic tadalafilu v závislosti na tabletačním tlaku, přičemž byla vyjádřená exponenciálně klesající závislost redukce velikosti částic s narůstajícím tlakem. Metodika byla podpořena výsledky známých semiempirických metod (Hecklova analýza, výpočet elastické a plastické energie, apod.), které vyjádřenou závislost potvrdily[48]. Semiempirické metody ovšem nejsou schopné vyjádřit změnu velikosti exaktně, pouze trendově. Díky HSM se tedy nyní nabízí nové možnosti při analýze chování, fragmentace a interakce částic při formulaci tablet. Tato analýza nabývá v poslední době velkého významu díky stále větším snahám o zvýšení rozpouštěcí rychlosti API, a to především formulací léčivého přípravku.



Obr. 5. **Identifikace částic tadalafilu pomocí HSM v dezintegrované tabletě porovnáním snímku před (285,2 °C) a po (311,6 °C) bodu tání tadalafilu.** Částice tadalafilu jsou zvýrazněny ve snímku vlevo

4. Závěr

Pokrok v analýze pevné fáze, především díky HSM, nyní umožňuje lépe a komplexně porozumět dějům probíhajícím při změnách teploty. V některých případech jsou endotermní či exotermní projevy natolik složité, že je nelze s přesností vyjádřit pomocí konvenčních termických metod a právě kombinace s HSM umožňuje lépe porozumět a v konečném důsledku lépe kontrolovat farmaceutické pevné látky.

Vizualizace pomocí HSM umožňuje detekovat nové pevné fáze. V tomto směru nalézá tato technika v poslední době uplatnění při screeningu kokrystalů a při studiích eutektického profilu binárních systémů. Mimo to nabízí unikátní pohled do problematiky polymorfních přechodů, teplotního chování rozdílných krystalových forem jedné substance a problematiky interakcí API-excipient (nebo API-API). Novodobé použití při identifikaci částic API ve směsi s excipienty a při kvantifikaci amorfních tuhých disperzí podtrhuje mnohostrannost této techniky, díky které věříme, že její celkový potenciál pro farmaceutickou analýzu ještě nebyl zcela vyčerpán.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2015).

Seznam použitých zkratek

API	active pharmaceutical ingredient (aktivní farmaceutická substance)
ASA	acetylsalicylic acid (acetylsalicylová kyselina)
DES	deep eutectic solvent (hluboce eutektická rozpouštědla)
DVČ	distribuce velikosti částic
DSC	differential scanning calorimetry (diferenční skenovací kalorimetrie)
HSM	hot-stage microscopy (mikroskopie s vyhřívaným stolkem)
PEO	polyethylen oxid
SRO	short range order (uspořádání na krátkou vzdálenost)
TTM	transition temperature microscopy
TGA	termogravimetrická analýza
XRD	X-ray diffraction (rentgenová difrakce)
XRSCD	X-ray single-crystal diffraction (rentgenová difrakce na monokrystalu)

LITERATURA

1. Storey R. A., Ymen I.: *Solid State Characterization of Pharmaceuticals*. Wiley-Blackwell, West Sussex 2011.
2. Kunhert-Brandstatter M.: *Thermomicroscopy in the Analysis of Pharmaceuticals*. Pergamon, Oxford 1971.
3. Stieger N., Aucamp M., Zhang S.-W., de Villiers M. M.: Am. Pharm. Rev *15*, 32 (2012).
4. Fini A., Cavallari C., Ospitalli F.: Eur. J. Pharm. Biopharm. *70*, 409 (2008).
5. Šimek M., Grünwaldová V., Kratochvíl B.: BioMed Res. Int. *2014*, 1 (2014).
6. Duncan Q. M.: *Thermal Analysis of Pharmaceuticals*. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton 2007.
7. Tisot R. G., Rodriguez M.: International Centre for Diffraction Data (1999).
8. http://www.anasysinstruments.com/, staženo 22. června 2012.
9. McCrone W. C., McCrone L. B., Delly J. G.: *Polarized Light Microscopy*. McCrone Research Institute, Chicago 1984.

10. Chamot E. M., Mason C. W.: *Handbook of Chemical Microscopy*. Wiley-Interscience, New York 1940.
11. Aulton M. E.: *Pharmaceutics - The science of dosage form design*. Churchill Livingstone, London 2001.
12. Korandia V. S., Chawla G., Bansal A. K.: J. Gener. Med. *2*, 335 (2005).
13. *Handbook of Pharmaceutical Analysis*, (L. Ohannesian, A. Streeter, ed.). Marcel Dekker Inc., New York 2002.
14. Kuhnert-Brandstätter M.: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, Amsterdam 1982.
15. Mura P., Faucci M. T., Maderioli A., Bramanti G., Ceccarelli L.: J. Pharm. Biomed. Anal. *18*, 151 (1998).
16. Chadha R., Arora P., Bhandari S., Bala M.: *Current microscopy contributions to advances in science and technology*, (Mendez-Vilas A., ed.). Formatex Research Center, Barcelona 2012.
17. Hilfiker R.: *Polymorphism: In the Pharmaceutical Industry*. 1 vydání. Wiley-VCH, Weinheim 2006.
18. Lin S.-Y., Cheng W.-T.: J. Raman Spectrosc. *Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)*, 1 (2011).
19. Bakar A. M. R., Nagy Z. K., Rielly C. D.: J. Therm. Anal. Calorim. *99*, 609 (2010).
20. Buttini F., Miozzi M., Balducci A. G., Royall P. G., Brambilla G., Colombo P., Bettini R., Forbes B.: Int. J. Pharm. *465*, 42 (2014).
21. Friščić T., Jones W.: Faraday Discuss. *136*, 167 (2007).
22. Roy S., Aitipamula S., Nangia A.: Cryst. Growth Des. *5*, 2268 (2005).
23. An J. H., Choi G. J., Kim W. S.: Int. J. Pharm. *422*, 185 (2012).
24. Hsu C.-H., Ke W.-T., Lin S.-Y.: J. Pharm. Pharmaceut. Sci. *13*, 67 (2010).
25. Kratochvíl B., Seilerová L., Sládková V., Šimek M.: *Chemie a fyzika pevných léčiv*, skripta VŠCHT Praha 2014.
26. Lua J., Lia Y.-P., Wanga J., Lia Z., Rohani S., Ching C.-B.: J. Cryst. Growth *335*, 110 (2011).
27. Lu J., Rohani S.: Curr. Med. Chem. *16*, 884 (2009).
28. Chadha R., Saini A., Arora P., Jain D. S., Dasgupta A., Guru Row T. N.: CrystEngComm *13*, 6271 (2011).
29. Shikhar A., Bommana M. M., Gupta S. S., Squillante E.: J. Supercrit. Fluids *55*, 1070 (2010).
30. Berry D. J., Seaton C. C., Clegg W., Harrington R. W., Coles S. J., Horton P. N., Hursthouse M. B., Storey R., Jones W., Friščić T., Blangden N.: Cryst. Growth Des. *8*, 1697 (2008).
31. Aitipamula S., Chow P. S., Tan R. B. H.: CrystEngComm *11*, 889 (2009).
32. Seefeldt K., Miller J., Alvarez-Núñez F., Rodríguez-Hornedo N.: J. Pharm. Sci. *96*, 1147 (2007).
33. DiNunzio J. C., Brough C., Hughey J. R., Miller D. A., Williams Iii R. O., McGinity J. W.: Eur. J. Pharm. Biopharm. *74*, 340 (2010).
34. Lekšić E., Pavlović G., Meštrović E.: Cryst. Growth Des. *12*, 1847 (2012).
35. Morrison H. G., Sun C. C., Neervannan S.: Int. J. Pharm. *378*, 136 (2009).
36. Miroshnyk I., Mirza S., Sandler N.: Expert Opin. Drug Delivery *6*, 333 (2009).
37. Cabeza A. J. C., Day G. M., Motherwell W. D. S., Jones W.: Chem. Commun. *2007*, 1600.
38. Braun D. E., Kahlenberg V., Gelbrich T., Ludescher J., Griesser U. J.: CrystEngComm *10*, 1617 (2008).
39. Dong Z., Young V. G., Padden B. E., Schroeder S. A., Prakash I., Munson E. J., Grant D. J. W.: J. Chem. Crystallogr. *29*, 967 (1999).
40. Chawla G., Bansal A. K.: Sci. Pharm. *77*, 695 (2009).
41. Lloyd G. R., Craig D. Q. M., Smith A.: Int. J. Pharm. *158*, 39 (1997).
42. Telang C., Suryanarayanan R., Yu L.: Pharm. Res. *20*, 1939 (2003).
43. Lakshman J. P., Cao Y., Kowalski J., Serajuddin A. T. M.: Mol. Pharmaceutics *5*, 994 (2008).
44. Sims J. L., Carreira J. A., Carrier D. J., Crabtree S. R., Easton L., Hancock S. A., Simcox C. E.: Pharm. Dev. Technol. *8*, 119 (2003).
45. Gibson M.: *Pharmaceutical Preformulation and Formulation*. 2 vydání. Informa Healthcare USA, Inc., New York 2009.
46. Harding L., Qi S., Hill G., Reading M., Craig D. Q. M.: Int. J. Pharm. *354*, 149 (2008).
47. Šimek M., Grünwaldová V., Kratochvíl B.: Chem. Listy *108*, 50 (2014).
48. Šimek M., Grünwaldová V., Kratochvíl B.: Pharm. Dev. Technol., DOI 10.3109/10837450.2015.1026608 (2015).
49. Yang M., Wang P., Huang C.-Y., Ku M. S., Liu H., Gogos C.: Int. J. Pharm. *395*, 53 (2010).

M. Šimek[a,b] and B. Kratochvíl[a] *([a]Department of Solid State Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague, [b]Zentiva, k.s., Prague):* **Hot-stage Microscopy in Pharmaceutical Industry**

Hot-stage microscopy (HSM) affords combined light microscopy and thermal analysis, enabling the study of materials as a function of temperature and time. This combination involves visual examination and gives valuable information on the compound regarding its melting point, phase transformation, new phase formation, solid-state interactions, particle and solid dispersions analysis during heating. HSM gives a unique opportunity to visually follow thermal changes. Model cases of HSM application show its current usage in pharmaceutical industry thus supporting and inspiring its research.